

Comparação de diferentes métodos de análise de manchas de sémen, em tecidos analisados na rotina forense

Mónica Alexandra Florêncio Gouveia

Mestrado em Genética Forense

Departamento de Biologia

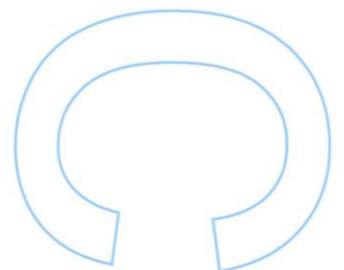
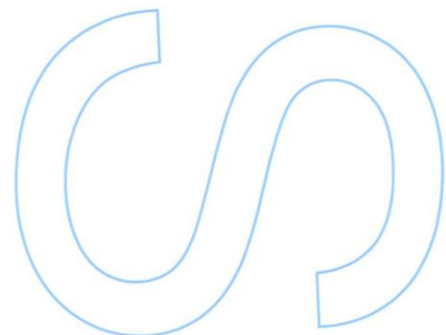
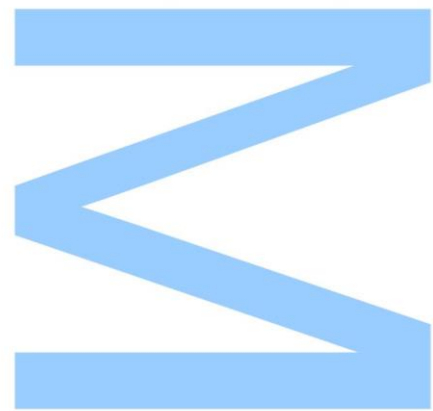
2015/2016

Orientador

Laura Sofia Ramos Mendes Cainé

Coorientador

Benedita Abreu Ferreira da Silva

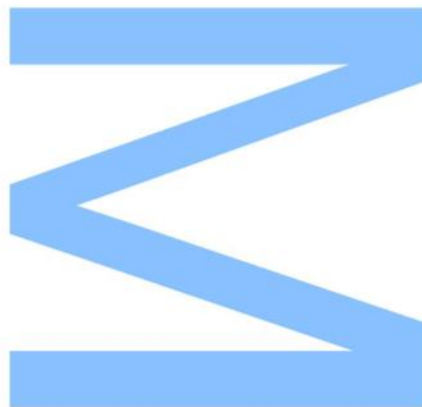




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Dissertação de candidatura ao grau de Mestre em Genética Forense,
submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

O presente trabalho foi desenvolvido no Instituto Nacional de
Medicina Legal e Ciências Forenses, sob a orientação científica da
Doutora Laura Cainé e coorientação da Mestre Benedita da Silva.

Dissertation for applying for a Master's degree in Forensic Genetics,
submitted to the Faculty of Sciences of the University of Porto.

The present work was developed at the Institute of Legal Medicine
and Forensic Sciences, under the scientific supervision of Laura
Cainé, PhD and Benedita da Silva, Master Degree.

“The little things are infinitely the most important.”

Sherlock Holmes

Agradecimentos

À minha orientadora doutora Laura, pela oportunidade que me deu de realizar este trabalho no Serviço de Genética e Biologia Forenses da Delegação Norte do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses e pela disponibilidade, apoio e incentivo que me deu ao longo deste ano.

À minha coorientadora Benedita por me ter guiado, pelo apoio, paciência, conselhos e pelos desabafos. Sem si nada teria sido possível, o seu apoio foi imprescindível para a realização deste trabalho. Obrigada também por me ter cartolado, foi um grande orgulho para mim e foram sem dúvida 5 horas que nunca vamos esquecer!

Às minhas eternas colegas de casa, vocês foram essenciais para manter a minha saúde mental. As longas conversas, o apoio incondicional, os risos e os desabafos vão ficar comigo para sempre, e sei que, mesmo separadas, levarei comigo amigas para a vida.

Aos meus amigos, um especial obrigado por estes divertidíssimos anos de faculdade, e por me terem ajudado e incentivado nos momentos mais desesperantes. Um especial obrigado ao Luís, cuja força, apoio e incentivo ao longo deste trabalho foram fundamentais.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram com a sua ajuda para a realização deste trabalho. Um especial agradecimento à professora Sara e professora Margarida por me terem ajudado na análise estatística.

Aos melhores pais do mundo, aos quais eu dedico este trabalho, um obrigado enorme por me terem permitido crescer fora de casa, pela força, apoio incondicional e pela confiança que depositaram em mim. Espero orgulhar-vos.

Ao melhor irmão, que apesar de estar longe, estará sempre comigo. Por todas as conversas e todas as gargalhadas! Obrigada por seres uma das melhores pessoas que conheço e por me teres presenteado com a sobrinha mais linda do mundo! Emilie, quando um dia leres isto por engano, obrigada por teres dado inspiração à tia a fazer o trabalho, mesmo sem saberes.

A todos vós, o maior e mais sincero obrigado!

Resumo

Um dos crimes mais prevalentes na sociedade atual são as agressões sexuais. Se o perpetrador for do sexo masculino, a deteção de sêmen pode ter extrema importância pois, para além de ajudar a comprovar contato sexual, permite também a realização de análises genéticas para determinar o perfil genético do possível perpetrador.

Nestes crimes a análise de vestígios em suporte têxtil (p.e. cuecas) é muito comum. Os métodos de recolha mais comuns de vestígios biológicos em têxteis são: cortar uma pequena secção do tecido analisando-a diretamente, friccionar uma zaragatoa de algodão humedecida na área de interesse, ou por meio de fita adesiva, pressionando repetidamente sobre a superfície, sendo este último método mais direcionado para a recolha de células epiteliais.

Neste trabalho foram comparados dois métodos de recolha de manchas de sêmen em têxteis, doadas por voluntários, através do uso de uma zaragatoa humedecida ou com a análise direta de parte do tecido. Ambas as técnicas foram testadas em tecidos analisados na prática laboratorial forense (acrílico, lã, poliéster e ganga) e foi comparada a capacidade de obter concentrações de DNA ótimas e perfis genéticos masculinos de qualidade.

Na identificação do posicionamento das manchas de sêmen nos tecidos, foi utilizada uma luz forense, que nem sempre se demonstrou eficaz. Foi também realizado um teste orientativo de deteção de PSA em cinco amostras nas quais não foi possível identificar manchas de sêmen.

Através deste trabalho foi possível verificar que o método da zaragatoa humedecida permitiu a recolha de uma menor quantidade de DNA quando comparada com o método direto. No entanto, em relação à qualidade dos perfis autossómicos obtidos, nos tecidos acrílico e lã (fibras mais espaçadas) foi obtida uma maior percentagem de perfis autossómicos masculinos completos com o método da zaragatoa. Por outro lado, no poliéster e na ganga (fibras mais apertadas), aconteceu o contrário, indicando que a recolha com a zaragatoa nestes tecidos não foi eficaz.

Nas amostras problema nas quais não foi possível obter perfil genético masculino, foi realizada a análise do haplótipo do cromossoma Y. A obtenção de haplótipos do cromossoma Y pode ser importante em tribunal na exclusão de suspeitos ou inclusão de indivíduos aparentados pela linhagem paterna.

Foi também realizada a amplificação de cinco amostras nas quais não se obteve perfil genético autossómico masculino com um *kit* que possui um sensor de qualidade. Nesta análise a amplificação ocorreu com sucesso, provavelmente por apresentar uma química mais resistente a compostos inibitórios.

Palavras-chave: Crimes sexuais, manchas de sémen, tecidos, métodos de recolha, inibidores de PCR, luz forense, perfis genéticos.

Abstract

Nowadays one of the most common crimes is sexual assault. If the perpetrator is male, semen detection can be extremely important since, in addition to help prove sexual contact, it also allows the performance of genetic analyses to determine the genetic profile of the possible perpetrator.

Textile tissue (e.g. underwear) analyses are very common on these types of crimes. The most common methods to collect biological residues are: cutting a small section of the fabric analysing it directly, rubbing a wet cotton swab in the trace, or pressing repeatedly tape on the fabric, the last one being mostly used for collecting epithelial cells.

This project focused on the comparison of two methods of semen stains collection in textiles, donated by volunteers, through the use of a wet swab or with the direct analyses of a portion of the tissue. Both techniques were tested on tissues commonly used in forensic laboratory practice (acrylic, wool, polyester and denim). The results for the different tissues were compared on the capacity to obtain optimum DNA concentrations and the quality of genetic male profiles.

The use of the forensic light was not always effective in identifying the position of the semen stains. On the five samples where this method was not applicable, an orientation test to detect the presence of PSA was conducted.

Through this project, it was possible to verify that the wet swab method allowed the collection of lower DNA quantity when compared to the direct method. However, regarding the quality of the autosomal profiles obtained on acrylic and wool fabric (spaced fibers), a greater percentage of complete autosomal male profiles was obtained using the wet swab method. On the other hand, polyester and denim (tighten fibers) had the opposite result, evincing that the wet swab method was not effective on these fabrics.

The Y chromosome haplotype was analysed for samples in which was not possible to obtain a male genetic profile. In court, the Y chromosome haplotype can be very important to exclude suspects or to include individuals related by paternal lineage.

A kit with a quality sensor was used to amplify five samples in which no autosomic male genetic profile was obtained. This last analysis was successful, probably due to its chemistry being more resistant to inhibitory compounds.

Key-words: Sexual assault, semen stains, textiles. collecting methods, PCR inhibitors, forensic light, genetic profiles.

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo	iii
Abstract	v
Índice.....	vii
Lista de tabelas.....	xi
Lista de figuras	xiii
Lista de abreviaturas.....	xv
1. Introdução.....	1
1.1. Violência.....	1
1.2. Violência sexual.....	1
1.3. Perícias Médico-Legais e Forenses	4
1.4. Vestígios forenses	5
1.5. Manchas de sémen em vestígios têxteis	6
1.6. Análise de DNA	8
1.7. Métodos de recolha em materiais têxteis	9
2. Objetivos.....	10
3. Materiais e métodos	11
3.1. Amostragem	11
3.2. Codificação das amostras.....	12
3.3. Preparação das amostras.....	14
3.3.1. Preparação das amostras referência	14
3.3.2. Preparação das amostras problema	14
3.4. Extração de DNA.....	15
3.4.1. Extração de DNA pelo método de Chelex®	15
3.4.2. Procedimento	15
3.5. Quantificação de DNA	15
3.6. Amplificação de DNA.....	16

3.6.1.	Kit de amplificação AmpF ℓ STR $^{\circledR}$ MiniFiler $^{\text{TM}}$	17
3.6.2.	Kit de amplificação Yfiler $^{\circledR}$ Plus PCR.....	17
3.6.3.	Kit de amplificação Investigator Argus X-12 QS.....	18
3.7.	Eletroforese capilar.....	19
3.7.1.	Kit AmpF ℓ STR $^{\circledR}$ MiniFiler $^{\text{TM}}$	19
3.7.2.	Kit Yfiler $^{\circledR}$ Plus PCR	19
3.7.3.	Kit Investigator Argus X-12 QS	20
3.8.	Análise dos perfis de DNA	20
3.9.	Análise de Resultados	20
3.9.1.	Análise estatística.....	20
3.10.	Teste orientativo.....	20
3.10.1.	SERATEC $^{\circledR}$ PSA SEMIQUANT	20
4.	Resultados.....	22
4.1.	Preparação das amostras problema	22
4.2.	Quantificação das amostras problema.....	25
4.2.1.	Análise estatística.....	27
4.3.	Perfis genéticos	28
4.3.1.	Kit AmpF ℓ STR $^{\circledR}$ MiniFiler $^{\text{TM}}$	28
4.3.1.1.	Análise estatística	30
4.3.2.	Kit Yfiler $^{\circledR}$ Plus PCR	31
4.3.3.	Kit Investigator Argus X-12 QS	32
4.4.	Teste orientativo	33
4.4.1.	SERATEC $^{\circledR}$ PSA SEMIQUANT	33
5.	Discussão.....	34
5.1.	Preparação das amostras problema e teste orientativo	34
5.2.	Quantificação das amostras problema.....	34
5.2.1.	Análise estatística.....	35
5.3.	Perfis genéticos	35
5.3.1.	Kit AmpF ℓ STR $^{\circledR}$ MiniFiler $^{\text{TM}}$	35

5.3.1.1.	Análise estatística	36
5.3.2.	Kit Yfiler® Plus PCR	36
5.3.3.	Kit Investigator Argus X-12 QS	37
6.	Conclusões	38
7.	Referências bibliográficas	39
8.	Anexos	47

Lista de tabelas

Tabela I Codificação das amostras referência dos voluntários.	13
Tabela II Codificação das amostras problema.	13
Tabela III Ciclo da PCR do AmpF ℓ STR $^{\circ}$ MiniFiler $^{\text{TM}}$ (AB).	17
Tabela IV Ciclo da PCR do Yfiler $^{\text{TM}}$ Plus (AB).	18
Tabela V Ciclo da PCR do Investigator Argus X-12 QS.	19
Tabela VI Resultados da quantificação de DNA (Y e SA) das amostras problema fornecidas pelos voluntários em cada tecido e técnica utilizada Legenda: AD - tecido acrílico com método direto; AZ - tecido acrílico com método zaragoza; PD - tecido poliéster com método direto; PZ - tecido poliéster com método zaragoza.; LD - tecido lã com método direto; LZ - tecido lã com método zaragoza; GD - tecido ganga com método direto e GZ - tecido ganga com método com zaragoza.. Erro! Marcador não definido.	
Tabela VII Análise descritiva dos dados (média, DP e mediana) e teste estatístico de Wilcoxon comparando o método direto com o método zaragoza dentro de cada tecido, relativamente à concentração de DNA (SA) obtida. Nível de significância: 0,05.	27
Tabela VIII Análise descritiva dos dados (média, DP e mediana) e teste estatístico de Wilcoxon comparando o método direto com o método zaragoza dentro de cada tecido, relativamente à concentração de DNA (Y) obtida. Nível de significância: 0,05.....	27
Tabela IX Análise descritiva dos dados (média, DP e mediana) e teste estatístico de Wilcoxon comparando o método direto com o método zaragoza dentro de cada tecido, relativamente à capacidade de obtenção de perfis autossómicos masculinos. Nível de significância: 0,05.	30
Tabela X Obtenção de haplótipo X de 5 amostras nos kits de amplificação AmpF ℓ STR $^{\circ}$ MiniFiler $^{\text{TM}}$ (AB), Yfiler $^{\circ}$ Plus PCR (AB) e Investigator Argus X-12 QS.....	32
Tabela XI Resultados do teste orientativo SERATEC $^{\circ}$ PSA SEMIQUANT, C10 e dos perfis obtidos nos tecidos onde não foi possível identificar as manchas de sémen.....	33

Lista de figuras

Figura 1 Tipologia da violência. Adaptado do relatório mundial sobre violência e saúde. Genebra: Organização Mundial da Saúde, 2002.	1
Figura 2 Gráfico do número de crimes contra a liberdade e autodeterminação sexual registados em Portugal entre 2010 e 2015. Fonte: Direção Geral da Política de Justiça — Projeto HERMES — Estatísticas Oficiais da Justiça. Última atualização 31.03.2016 (http://www.siej.dgpj.mj.pt).	3
Figura 3 Luz forense (Crime-lite™ C2, Mason Vactron) e óculos protetores.	14
Figura 4 Fotografias do tecido de poliéster, já cortado, sem incidência de luz UV (1 - manchas de sémen quase impercetíveis) e com incidência de luz UV (2 - manchas de sémen bem visíveis).	14
Figura 5 Diluição em série para a curva padrão necessária para a quantificação de DNA.	16
Figura 6 Imagem ilustrativa do teste SERATEC® PSA SEMIQUANT (Fonte: SERATEC® PSA SEMIQUANT user instructions).	21
Figura 7 Fotografia à luz natural dos tecidos de ganga com manchas de sémen já delimitadas.	22
Figura 8 Fotografia à luz natural dos tecidos de acrílico com manchas de sémen já delimitadas.	22
Figura 9 Fotografia com luz forense de uma mancha de sémen no poliéster.	23
Figura 10 Fotografia com luz forense de uma mancha de sémen no acrílico.	23
Figura 11 Fotografia com luz forense de uma mancha de sémen na lã.	24
Figura 12 Fotografia com luz forense de um tecido de lã de cor vermelho “fluorescente”.	24
Figura 13 Fotografia com luz forense de um tecido ganga.	24

Figura 14 Gráfico com as médias gerais de concentração de DNA (SA e Y) (ng/μL) com o método da zaragatoa e direto.	25
Figura 15 Gráfico com as médias da quantidade de DNA SA nos diferentes tecidos, com ambos os métodos (direto e zaragatoa). Linha a tracejado representa a concentração de DNA ideal para PCR	26
Figura 16 Gráfico da média das quantidades de DNA Y nos diferentes tecidos, com ambos os métodos (direto e zaragatoa). Linha a tracejado representa a concentração de DNA ideal para PCR.	26
Figura 17 Gráfico com o número total de perfis masculinos completos, incompleto e sem perfil obtidos num total de 128 perfis analisados com o kit AmpF ℓ STR® MiniFiler™ (AB).	29
Figura 18 Gráfico geral com a percentagem de perfis autossómicos masculinos completos, incompletos e sem perfil obtidos a partir das amostras problema fornecidas por todos os voluntários, tanto casais como masculinos, nos diferentes tecidos e com ambas as técnicas, com recurso ao o kit AmpF ℓ STR® MiniFiler™ (AB). Para cada grupo a dimensão da amostra é de N=16	29
Figura 19 Gráfico circular com o numero total de haplótipos do cromossoma Y completos, incompleto e sem perfil obtidos a partir da análise de 41 amostras problema fornecidas pelos voluntários (casais ou masculinos) analisadas com o kit Yfiler® Plus PCR (AB).	31
Figura 20 Gráfico com o numero total de haplótipos do cromossoma Y completos, incompleto e sem perfil obtidos num total de 41 perfis analisados com recurso ao o kit Yfiler® Plus PCR (AB).	32
Figura 21 Resultados do teste orientativo SERATEC® PSA SEMIQUANT, C10 de cinco amostras problema (1 - C11, lâ, 2 - C10, ganga, 3 - C9, ganga, 4 - H4, lâ e 5 - C12, lâ).	33

Lista de abreviaturas

- ALS** – Fonte de luz alternativa (*alternate light sources*)
- AD** – Tecido acrílico com método de recolha direto
- AP** – Fosfatase ácida (*acid phosphatase*)
- AS** – Agressão sexual
- AZ** – Tecido acrílico com método de recolha com zaragatoa
- C** – *Control line*
- CP** – Código penal
- DNA** - Ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)
- DP** – Desvio padrão
- GD** – Tecido ganga com método de recolha direto
- GZ** – Tecido ganga com método de recolha com zaragatoa
- INMLCF** – Instituto de Medicina Legal e Ciências Forenses
- LD** – Tecido lã com método de recolha direto
- LZ** – Tecido lã com método de recolha com zaragatoa
- PCR** – Reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)
- PD** – Tecido poliéster com método de recolha direto
- PSA** - Prostate-specific antigen
- PZ** – Tecido poliéster com método de recolha com zaragatoa
- rfu** – *Relative fluorescent units*
- SA** – *Small autosomal DNA*
- STR** – *Short tandem repeats*
- T** – *Test result line*

1.Introdução

1.1. Violência

Todos os anos mais de um milhão de pessoas perdem as suas vidas e muitas outras sofrem consequências não fatais em consequência da violência, estando esta entre as principais causas de morte de pessoas na faixa etária dos 15 aos 44 anos. A Quadragésima Nona Assembleia Mundial de Saúde, em 1996, adotou a Resolução WHA49.25, declarando a violência como sendo um problema de crescente importância na saúde pública no mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a “Violência” tem como definição o uso intencional da força física ou do poder (real ou em ameaça), contra si ou contra outra pessoa, grupo ou comunidade, que resulte ou possa resultar em lesão, morte, dano psicológico, deficiência de desenvolvimento ou privação (Dahlberg and Krug, 2002). A violência pode ser dividida em três categorias, pode ser “autoinfligida”, “interpessoal” ou “coletiva”. Cada uma destas categorias abrange outros tipos mais específicos de violência e a sua natureza (Figura 1).

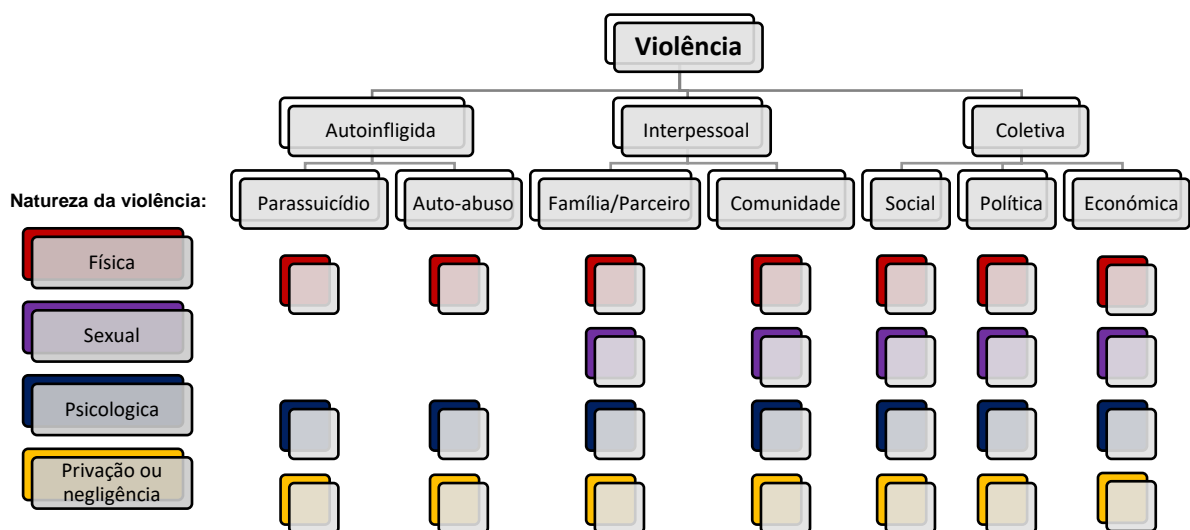


Figura 1 Tipologia da violência. Adaptado do relatório mundial sobre violência e saúde. Genebra: Organização Mundial da Saúde, 2002.

1.2. Violência sexual

Relativamente à violência de natureza sexual, sabe-se que esta afeta milhões de pessoas em todo o mundo, a sua maioria do género feminino, sendo um grave problema de saúde pública com consequências graves para a saúde mental e física da vítima. Os crimes desta natureza têm um impacto negativo profundo no bem-estar, qualidade de vida e na dignidade da vítima, que podem permanecer durante toda a sua

vida. Pode ter como consequência a diminuição do potencial reprodutivo e da saúde sexual, podendo gerar, por exemplo, gravidezes indesejadas, infeções sexualmente transmissíveis, transtorno de stress pós-traumático, o aumento do risco de adquirir comportamentos sexuais de risco, entre outros (World Health Organization, 2003).

A “Violência Sexual” é definida como sendo qualquer ato, tentativa, insinuação e comentário sexual indesejado, ou atos direcionados ao tráfico sexual ou contra a sexualidade de uma pessoa usando a coação, praticados por qualquer indivíduo, independentemente da sua relação com a vítima e em qualquer local (Jewkes et al., 2002). Os perpetradores deste tipo de crime procuram gratificação sexual, no entanto, o principal motivo subjacente é frequentemente a expressão de poder, controlo e domínio sobre a vítima. O perpetrador do abuso pode ser um conhecido, um namorado, um amigo, um familiar, um parceiro ou um completo desconhecido, apesar de ser mais comum ser alguém conhecido da vítima (Costa et al., 2014; Magalhães and Vieira, 2013)

Um estudo realizado em múltiplos países pela OMS sobre a saúde da mulher e a violência doméstica contra a mulher indicou que 15% a 71% das vítimas sofrem violência física e/ou sexual por um parceiro íntimo em algum momento das suas vidas (García-Moreno et al., 2005). Em Portugal, o estudo mais recente de prevalência de violência de género (Lisboa et al., 2009) revelou que 38% das mulheres diz ter sido em algum momento da sua vida vítima de um ato de violência psicológica, física ou sexual. A OMS salienta que uma em cada cinco mulheres assinala ter sido vítima de abuso sexual em criança e que uma em cada três mulheres sofreu atos de violência física ou sexual nas relações de intimidade em algum momento da sua vida.

Este tipo de violência tem uma natureza ubíqua sendo reportada em todo mundo, em todas as culturas, setores da sociedade, classes sociais e em todos os níveis económicos e educacionais, podendo-se apresentar de diferentes formas e em várias circunstâncias. É comum o abuso sexual ocorrer em casa da vítima, ou em casa do perpetrador, no entanto, esta pode também ocorrer noutros locais como, por exemplo, no trabalho, na escola, nas prisões, em carros, na rua ou espaços públicos (World Health Organization, 2003).

Num estudo retrospectivo realizado na Delegação Norte do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (INMLCF) em 1054 casos de abuso sexual de menores, 99,1% dos agressores são do género masculino, onde 40% destes apresentaram relação intrafamiliar, e 83% das vítimas são do género feminino com uma

idade média de 9 anos (Magalhães et al., 2009). Noutro estudo retrospectivo realizado na Delegação Sul do INMLCF em 362 casos de alegadas vítimas de crimes sexuais, 92% das vítimas são do sexo feminino. Neste estudo 26% das vítimas femininas tinham entre 0 e 9 anos de idade, 40% tinham entre os 10 e os 19 anos de idade, 19% tinham entre os 20 e os 29 anos de idade e 15% tinham mais de 30 anos de idade (Santos et al., 2006).

Em Portugal, os crimes contra a liberdade sexual e a autodeterminação sexual estão abrangidos nos crimes contra as pessoas e só no ano 2015 foram reportados 2579 casos de crimes deste tipo em todo o país (Figura 2) (Estatística Oficial da Justiça).

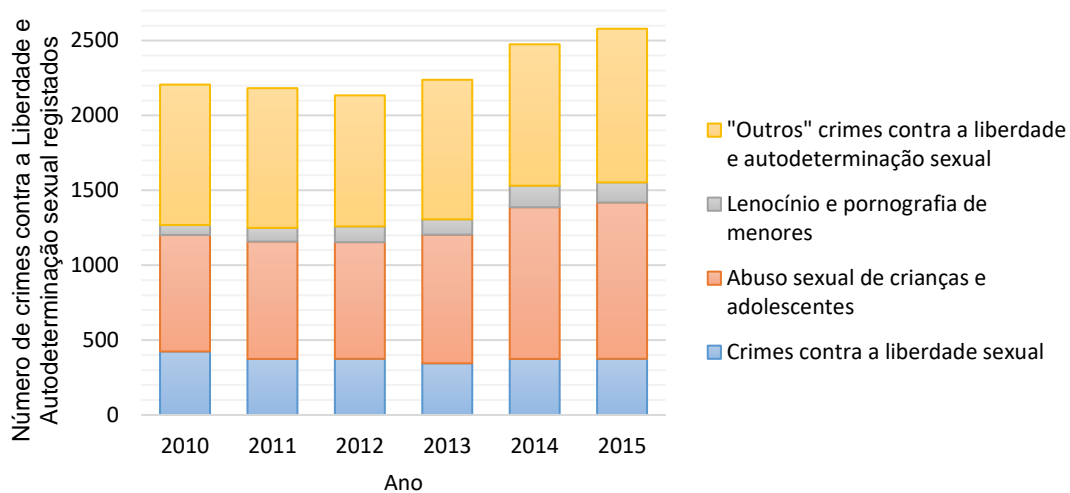


Figura 2 Gráfico do número de crimes contra a liberdade e autodeterminação sexual registados em Portugal entre 2010 e 2015. Fonte: Direção Geral da Política de Justiça — Projeto HERMES — Estatísticas Oficiais da Justiça. Última atualização 31.03.2016 (<http://www.siej.dgpj.mj.pt>).

No que diz respeito aos crimes contra a liberdade sexual o Código Penal Português (CP), no capítulo v, prevê os seguintes tipos legais de crime: coação sexual (artigo 163.º CP), violação (artigo 164.º CP), abuso sexual de pessoa incapaz de resistência (artigo 165.º CP), abuso sexual de pessoa internada (artigo 166.º CP), fraude sexual (artigo 167.º CP), procriação artificial não consentida (artigo 168.º CP), lenocínio (artigo 169.º CP) e importunação sexual (artigo 170.º CP). Relativamente aos crimes contra a autodeterminação sexual, o Código Penal Português, no capítulo v, prevê os seguintes tipos legais de crime: abuso sexual de crianças (artigo 171.º CP), abuso sexual de menores dependentes (artigo 172.º CP), atos sexuais com adolescentes (artigo 173.º CP), recurso à prostituição de menores (artigo 174.º CP), lenocínio de menores (artigo 175.º CP), pornografia de menores (artigo 176.º CP) e aliciamento de menores para fins sexuais (artigo 176.º CP).

1.3. Perícias Médico-Legais e Forenses

A realização de perícias médico legais e forenses em vítimas de alegada agressão sexual (AS) é um processo fundamental e incontornável na produção de prova. O exame médico-legal da vítima é de extrema importância pois permite recolher informações e evidências forenses que podem ser relevantes para a formação da convicção das autoridades judiciárias e judiciais sobre os factos alegadamente ocorridos (Magalhães et al., 2013). Deve ser oferecido às vítimas de AS um exame médico-legal completo que inclua uma avaliação inicial e a obtenção de consentimento informado; uma história médica forense, um exame físico que inclua um exame génito-anal detalhado; uma classificação das lesões e respetivo registo fotográfico; uma recolha de amostras médicas para fins de diagnóstico; uma recolha de amostras forenses; uma rotulagem, embalagem e transporte das amostras forenses (de forma a manter a cadeia de custódia das provas) e uma terapêutica adequada quando necessária (World Health Organization, 2003).

Em casos de AS, as técnicas utilizadas no exame físico e na colheita de vestígios e outras amostras biológicas devem ter em consideração a idade e género da vítima, o tipo de contato sexual alegado e/ou suspeito, e o tempo decorrido entre o contato sexual e o exame médico-legal. Relativamente ao exame médico-legal, este deve ser realizado numa ordem lógica e sistematizada de modo a assegurar o conforto da vítima e a evitar perda e contaminação das amostras recolhidas. Deste modo aconselha-se que os passos do exame sigam a seguinte ordem (Magalhães et al., 2013):

- a) Região peri-oral;
- b) Região oral;
- c) Amostras referência;
- d) Cabelo e couro/cabeludo;
- e) Subungueais e exame das mãos;
- f) Peças de roupa, itens sanitários e outros objetos;
- g) Superfície cutânea em geral;
- h) Zaragatoas anais externas e exame da região perianal e anal externa;
- i) Região peri-anal e ano-retal;
- j) Região púbica;
- k) Região vulvar e vestibular;
- l) Região vaginal e colo uterino.

Uma evidência forense é, num sentido lato, qualquer elemento relativo a um alegado crime, que possa ser útil para o decorrer da investigação. Estas evidências podem fornecer informações à polícia sobre, por exemplo, o local onde ocorreu o alegado crime ou sobre a veracidade da prática do mesmo, a identificação ou exclusão do(s) suspeito(s) e sobre a veracidade das declarações da(s) vítima(s), suspeito(s) ou de testemunhas (Orphanou, 2015). A seleção, colheita, acondicionamento, preservação, armazenamento, conservação e transporte, até ao processamento laboratorial final destes vestígios, realizado por laboratórios de Genética Forense, constituem, por isso, uma parte fundamental, pois condicionam o sucesso ou insucesso dos resultados analíticos. A fiabilidade e validade dos resultados irão proporcionar provas com valor em tribunal que poderão ser cruciais para o desenvolvimento da investigação (Magalhães et al., 2013).

1.4. Vestígios forenses

As evidências forenses podem ser divididas em duas grandes categorias: as “diretas” e as “circunstanciais”. As “evidências diretas” são por exemplo as declarações das vítimas ou testemunhas e são bastante importantes, apesar de poderem ser refutadas, por exemplo, através de estudos de DNA. As “evidências circunstanciais” são evidências indiretas colhidas da vítima, do suspeito, da cena do crime ou de uma base de dados, que necessitam ser identificadas e comparadas com uma amostra controlo/referência de modo permitir encontrar, ou não, uma correspondência. Estas podem ser físicas ou biológicas e são na sua maioria frágeis e em pouca quantidade, existindo um risco substancial de destruição/perda e/ou contaminação (Magalhães et al., 2013).

Em todos os crimes contra pessoas, como no caso das AS, o contato entre a vítima e o perpetrador e/ou com o meio envolvente, pode ocorrer transferência de vestígios do perpetrador para a vítima e/ou cena do crime e vice-versa. Os vestígios físicos incluem impressões digitais, palmares, plantares, labiais, de solas de calçado, como também fibras, tintas, terra, areia, vidro, resíduos de metais/explosivos ou de disparos de armas de fogo, entre outros. Os vestígios biológicos normalmente pertencem ou à vítima ou ao perpetrador do crime e podem incluir sémen, fluído vaginal, saliva, cabelos ou pelos, células epiteliais da pele, sangue, suor, fezes ou urina. Estes podem ser encontrados na roupa das vítimas, no seu corpo e/ou na cena do crime, pelo que a polícia deve ser informada relativamente à necessidade de proceder ao

isolamento e proteção do local e da colheita dos vestígios que possam eventualmente estar presentes (Magalhães et al., 2013).

Nos crimes sexuais é valorizada sobretudo a presença de sémen, dada a sua importância para comprovar o contato sexual, bem como para identificar o suspeito através de estudos de DNA (Allard et al., 2007; Burg et al., 2011; Butler, 2009; Evers et al., 2009; Magalhães et al., 2013; Morling, 2009). No caso de uma AS onde, por exemplo, tenha havido penetração vaginal com ejaculação, o sémen pode escorrer da vagina para as cuecas da vítima. Por este motivo, em casos de AS, é muito comum a análise deste tipo de vestuário (Allard et al., 2007; Davidson and Jallowiecki, 2012).

Relativamente ao sémen, depois de uma ejaculação, este raramente se encontra presente na cavidade oral 6 horas após o contato sexual, na região anorretal depois de 24 horas e na cavidade vaginal depois de 72 horas. Além destas limitações, o comportamento e práticas da vítima depois da AS são de extrema importância pois podem diminuir a possibilidade de encontrar sémen no seu corpo (p.e. urinar, defecar, lavar os dentes, tomar banho ou lavar partes do corpo, comer, beber, mascar, cuspir, entre outras atividades) (Anderst, 2011; Kellogg, 2011). Por outro lado, nas peças de vestuário, vestígios secos de sémen podem manter-se estáveis e analisáveis durante anos, caso estas não sejam lavadas (Anderst, 2011). Neste caso, quando há suspeita de vestígios em peças de roupa, estas devem ser remetidas para o laboratório onde será realizada a colheita e análise em condições mais adequadas (Magalhães et al., 2013).

1.5. Manchas de sémen em vestígios têxteis

As manchas de sémen em tecidos absorventes e de cor clara tendem a apresentar uma morfologia semelhante a um mapa geográfico, enquanto que em tecidos pouco absorventes tendem a apresentar um aspeto macroscópico com vestígios esbranquiçados. Depois de secas, é comum as manchas de sémen apresentarem uma certa rigidez (Bardale, 2011). No entanto, nem todas as manchas de sémen são visíveis a olho nu, dependendo da quantidade de sémen depositado e do tipo de tecido (Gefrides and Welch, 2010). Antes da recolha para posteriores testes, é necessária saber a sua localização. Fontes de luz alternativas (ALS), tanto de luz infravermelha como de ultravioleta, podem ajudar a criar um contraste entre a fluorescência das proteínas do fluido corporal e o substrato de fundo, ajudando na sua localização. O sémen produz uma forte fotoluminescência ao longo de uma gama de comprimentos de onda (expostos a luz UV), e emite luminescência azul (Goodwin et al., 2011). Para confirmação de uma

mancha de sémen pode ser realizada uma pesquisa microscópica dos espermatozoides ou a utilização de testes orientativos que confirmem a presença de fosfatase ácida (AP) ou testes de *prostate-specific antigen* (PSA) (Butler, 2011).

A visualização de espermatozoides em manchas é o teste mais utilizado para comprovar a presença de sémen. No entanto, na pesquisa de espermatozoides é necessário ter em conta que em indivíduos azoospermicos (ausência espermatozoides) ou oligoespermicos (baixa contagem de espermatozoides) pode não ser possível a sua visualização. Nestes casos, é mais vantajoso a utilização de testes que identifiquem enzimas presentes no sémen (Butler, 2011). Também é necessário ter em consideração que os espermatozoides têm tendência a aderir aos tecidos de tal forma que se torna difícil a sua recolha para proceder à sua pesquisa, e que estes são extremamente frágeis quando secos e podem facilmente desintegrar-se se a mancha for lavada ou friccionada contra outro objeto, algo que pode ocorrer, por exemplo, no acondicionamento deste tipo de provas (Saferstein, 2006).

Um dos testes mais utilizados para identificação de manchas de sémen recorre à pesquisa de AP. Esta é uma enzima segregada pela próstata e encontrada no fluido seminal e em diversos fluidos corporais, mas que apresenta uma concentração 400 vezes superior no sémen (Saferstein, 2006; Sensabaugh, 1978). Tal, pode ser considerada uma desvantagem pois, não sendo uma substância presente exclusivamente no sémen, não pode ser considerado um “teste de certeza”. Para além disto, a enzima demonstra um declínio de atividade quando armazenada à temperatura ambiente (Herr et al., 1986). Por estas razões, os testes de deteção de AP são considerados meramente orientativos da presença de sémen (Laffan et al., 2011).

A deteção de PSA é outro teste também utilizado na identificação de sémen, este é um composto libertado pelas células epiteliais da próstata. Inicialmente pensava-se ser específico do sémen, no entanto, mais tarde verificou-se que também está presente em baixas concentrações no leite materno (Yu and Diamandis, 1995) e noutros fluidos (Diamandis and Yu, 1995; Lunetta and Sippel, 2009). Apesar disso, a deteção de PSA é considerado um dos métodos mais sensíveis para a deteção de sémen e pode ser aplicado a indivíduos com azoospermia (Magalhães et al., 2015).

1.6. Análise de DNA

A análise de polimorfismos *short tandem repeats* (STR) é a mais utilizada em identificação humana e análises de DNA forenses (Burg et al., 2011; Butler, 2006; Funes-Huacca et al., 2011). Esta análise é sensível, possui um elevado poder discriminante e permite a caracterização rápida de amostras forenses (Moretti et al., 2001). Os STR mais utilizados para a identificação humana são aqueles constituídos por uma unidade de repetição de 4 nucleótidos, pois são mais polimórficos, sofrem menos *stutter* e originam produtos de *polymerase chain reaction* (PCR) de tamanho reduzido, o que permite analisar amostras degradadas (Butler, 2009). Os produtos *stutter* são o resultado de erros de *slippage* da DNA polimerase que podem apresentar uma ou menos unidades de repetição em tamanho, relativamente ao verdadeiro alelo (Walsh et al., 1996). Outra análise importante em Genética Forense é a obtenção de haplótipos do cromossoma Y. Esta utiliza-se, por exemplo, na deteção de DNA masculino em casos de amostras de mistura mulher/homem, onde exista uma elevada concentração de DNA feminino, focando-se apenas em zonas do cromossoma Y (Burg et al., 2011; Hanson and Ballantyne, 2014; Morling, 2009).

Atualmente a análise de STR envolve a extração, purificação e quantificação do DNA de amostras forenses, seguida da amplificação, através da PCR, e da deteção dos alelos de acordo com os diferentes tamanhos, através de uma eletroforese capilar (Brevnov et al., 2009; Donachie et al., 2015). As amostras forenses podem apresentar-se degradadas, com pouca quantidade de DNA e com contaminantes e/ou inibidores de PCR que tornem a análise de DNA tão complexa que impeça a correta genotipagem dos perfis (Barbisin et al., 2009; Funes-Huacca et al., 2011; Hu et al., 2015; Larkin and Harbison, 1999; Lounsbury et al., 2014; Schmedes et al., 2013; Vallone et al., 2008; Wilson, 1997)

Os inibidores de PCR são uma das causas mais comuns de problemas na amplificação do DNA (Alaeddini, 2012). Estes podem impedir a amplificação através da degradação ou fixação ao DNA, ou por interação com a DNA polimerase (Wilson, 2001). A sua presença pode levar à perda total de alelos em análises de STR e a falsos resultados negativos, principalmente em amostras com baixa qualidade e/ou quantidade de DNA (Alaeddini, 2012; Funes-Huacca et al., 2011). Em amostras forenses é comum encontrar inibidores de PCR, tais como: hematina (sangue) (Akane et al., 1994); o colagénio e o cálcio (osso) (Bickley et al., 1996; Scholz et al., 1998); a melanina (pele e

no cabelo) (Yoshii et al., 1994) ácidos orgânicos (solo e outras amostras ambientais) (Young et al., 1993) e corante anil (têxteis) (Larkin and Harbison, 1999).

No caso da amostra estar contida num material têxtil, é necessário ter em conta que os corantes utilizados no fabrico dos mesmos podem ser problemáticos para a análise do DNA (Larkin and Harbison, 1999; Linacre et al., 2010; Zahra et al., 2011). A ganga, em particular, é um tecido de sarja onde o tom azulado é determinado pelo nível de corante anil presente, um conhecido inibidor da PCR (Larkin and Harbison, 1999; Uğur and Sarişik, 2014). A remoção ou diminuição da concentração destes inibidores antes da amplificação por PCR é fundamental para o sucesso da genotipagem (Hu et al., 2015).

1.7. Métodos de recolha em materiais têxteis

Para recolher o material biológico de uma amostra de material têxtil pode-se cortar parte da zona de interesse e armazenar num tubo estéril (Budowle et al., 1995), usar uma zaragatoa de algodão estéril, friccionando sobre a superfície do tecido e armazenar a ponta dentro de um tubo estéril (Van Oorschot et al., 2003), ou ainda pressionar uma fita adesiva sobre o tecido e, de seguida, cortar a fita para dentro de um tubo estéril, apesar deste último ser focalizado para a recolha de células epiteliais (Hall and Fairley, 2004). No processamento de amostras recolhidas a partir de têxteis, é necessário que o método seja o mais eficiente possível, de forma garantir uma transferência mínima de compostos inibitórios simultaneamente com um máximo possível concentração de DNA.

2. Objetivos

Este estudo tem como objetivos:

- Comparar dois métodos de recolha de manchas de sémen em tecidos:
 - Cortando diretamente parte do tecido para extração de DNA;
 - Utilizando uma zaragatoa humedecida para a recolha usando esta para a extração de DNA;
- Comparar os métodos de recolha em diferentes tipos de tecidos (com diferentes colorações, tipos de fibras e espaçamento entre estas), relativamente à capacidade destes em obter concentrações de DNA favoráveis a obter perfis genéticos de qualidade;
- Avaliar a capacidade de obter haplótipos do cromossoma Y em amostras nas quais não foi possível a obtenção de um perfil genético masculino;
- Testar amostras nas quais não se obteve perfil genético masculino, relativamente à presença de inibidores de PCR, através da amplificação com um *kit* que possui sensor de qualidade interno;
- Testar tecidos nos quais não foi possível identificar manchas de sémen relativamente à presença de PSA e comparar com os resultados dos perfis genéticos.

3. Materiais e métodos

3.1. Amostragem

Neste estudo os materiais biológicos analisados foram manchas de sémen, em diferentes têxteis e com diferentes métodos de recolha, fornecidas por doze casais heterossexuais e quatro participantes individuais voluntários do sexo masculino, após consentimento informado. A escolha dos casais voluntários residiu na possibilidade de obter perfis de mistura na análise, de modo a simular uma AS (por exemplo, roupas da vítima usada aquando da agressão). O interesse da participação de voluntários masculinos residiu na simulação de manchas de sémen em tecidos, aos quais o agressor se limpou após a AS.

Os participantes voluntários apresentavam idades compreendidas entre os 22 e os 42 anos, de origem caucasiana e constituem uma amostra não probabilística por conveniência.

Foi entregue aos voluntários um *kit* composto por quatro tecidos diferentes (ganga, lã, acrílico e poliéster), zaragatoas de referência (o *kit* entregue aos casais voluntários incluía duas zaragatoas de referência, uma para cada voluntário, e o *kit* entregue aos homens incluía apenas uma zaragatoa de referência), zaragatoas de recolha (para auxiliar na colocação do sémen no local do corpo escolhido) e documentos que incluem a informação sobre o projeto (Anexo 4), o procedimento a realizar (Anexo 6 e 7) e os consentimentos informados (Anexo 5), aprovados pela Comissão de Ética do Centro Hospitalar de São João, para lerem e assinarem.

Os tecidos foram escolhidos não só por serem problemáticos na rotina forense, mas também por serem observados frequentemente na rotina laboratorial. Estes apresentam diferentes colorações, fibras e espaçamento entre estas:

- a) Lã - Cor vermelha, grande espaçamento entre as fibras;
- b) Acrílico - Cor castanha, grande espaçamento entre as fibras;
- c) Ganga - Cor azul, pouco espaçamento entre as fibras;
- d) Poliéster - Cor de rosa, pouco espaçamento entre as fibras.

Os tecidos foram cortados em quadrados de aproximadamente 10x10cm, lavados e guardados em envelopes de papel devidamente identificados para serem entregues aos voluntários do estudo.

Foi pedido aos voluntários que fizessem a recolha de uma amostra de referência através do esfregaço de uma zaragatoa (*TRIPLE-HEAD CEP SWAB, FITZCO*) na parte interior da mucosa da cavidade oral, de forma a obter perfis genéticos para posterior comparação com os resultados das amostras problema (no caso da obtenção de perfis nestas amostras). Para a obtenção das amostras problema, foi pedido aos voluntários que optassem por um dos seguintes métodos, consoante o que considerassem mais cómodo:

a) foi pedido aos casais que o indivíduo do sexo feminino espalhasse sémen do indivíduo do sexo masculino numa zona anatomicamente preferencial de ambos (por exemplo, o antebraço). No caso dos voluntários individuais do sexo masculino o procedimento foi semelhante, tendo sido pedido ao participante a colocação da mancha no seu próprio corpo. O sémen a aplicar poderia ser recolhido utilizando um preservativo, ou um recipiente, e de seguida espalhado uma pequena quantidade com uma zaragatoa (*Collection Swab Viscose, Bioplaslab*). De seguida foi pedido que efetuassem a limpeza com um dos tecidos, de forma a retirar a totalidade do sémen, repetindo o processo para cada um dos tecidos.

b) foi pedido aos casais que o indivíduo do sexo masculino ejaculasse para uma zona anatómica do indivíduo do sexo feminino, preferencial de ambos. Aos voluntários individuais do sexo masculino foi também dada esta opção, devendo, no entanto, a ejaculação ocorrer para um local do seu próprio corpo. Ao limparem o ejaculado com os tecidos foi pedido que limpassem numa zona com menor quantidade de sémen, de forma a não causar uma mancha demasiado evidente nos tecidos, mimetizando uma limpeza superficial.

É importante referir que as amostras referência apresentam uma origem conhecida e servem de referência a um indivíduo, para determinação de um perfil genético, de forma a ser possível à *posteriori* comparar com os perfis obtidos das amostras problema. Já estas apresentam uma quantidade de DNA que pode ou não ser muito reduzida, um estado de degradação variável e a possibilidade de conterem compostos inibitórios.

3.2. Codificação das amostras

Por questões de organização e de confidencialidade do restante procedimento, tanto as amostras de referência dos voluntários, como as amostras problema, foram codificadas. As amostras de referência foram codificadas em formato de lista (Tabela I) e foi-lhes atribuído o código AM-R, por questões de conveniência, seguido de um

número atribuído aleatoriamente. O presente estudo está incluído num projeto de doutoramento no qual os participantes voluntários foram numerados do número 1 ao 32, sendo que os voluntários 13, 14, 21 e 22 não estão referidos na Tabela I pois não participaram neste estudo em particular.

Tabela I Codificação das amostras referência dos voluntários.

Codificação amostras referência			
AM-R1	AM-R8	AM-R17	AM-R26
AM-R2	AM-R9	AM-R18	AM-R27
AM-R3	AM-R10	AM-R19	AM-R28
AM-R4	AM-R11	AM-R20	AM-R29
AM-R5	AM-R12	AM-R23	AM-R30
AM-R6	AM-R15	AM-R24	AM-R31
AM-R7	AM-R16	AM-R25	AM-R32

As amostras problema foram codificadas com o número III, que se refere ao número do estudo na tese de doutoramento no qual está inserido, primeiro por ordem aleatória de casais (C1 a C12) e de seguida de ordem aleatória de homens (H1 a H4), por tecido (A – acrílico, G – ganga, L – lã e P – poliéster) e pelo método de recolha da amostra, (D – tecido foi cortado na zona de interesse e a análise foi feita diretamente a partir deste, ou Z – foi utilizada uma zaragatoa humedecida na zona de interesse de forma a recolher material biológico e a análise foi feita a partir desta), como pode ser visualizado na Tabela II.

Tabela II Codificação das amostras problema.

Método direto				Método zaragatoa			
acrílico	ganga	lã	poliéster	acrílico	ganga	lã	poliéster
IIIC1AD	IIIC1GD	IIIC1LD	IIIC1PD	IIIC1AZ	IIIC1GZ	IIIC1LZ	IIIC1PZ
IIIC2AD	IIIC2GD	IIIC2LD	IIIC2PD	IIIC2AZ	IIIC2GZ	IIIC2LZ	IIIC2PZ
IIIC3AD	IIIC3GD	IIIC3LD	IIIC3PD	IIIC3AZ	IIIC3GZ	IIIC3LZ	IIIC3PZ
IIIC4AD	IIIC4GD	IIIC4LD	IIIC4PD	IIIC4AZ	IIIC4GZ	IIIC4LZ	IIIC4PZ
IIIC5AD	IIIC5GD	IIIC5LD	IIIC5PD	IIIC5AZ	IIIC5GZ	IIIC5LZ	IIIC5PZ
IIIC6AD	IIIC6GD	IIIC6LD	IIIC6PD	IIIC6AZ	IIIC6GZ	IIIC6LZ	IIIC6PZ
IIIC7AD	IIIC7GD	IIIC7LD	IIIC7PD	IIIC7AZ	IIIC7GZ	IIIC7LZ	IIIC7PZ
IIIC8AD	IIIC8GD	IIIC8LD	IIIC8PD	IIIC8AZ	IIIC8GZ	IIIC8LZ	IIIC8PZ
IIIC9AD	IIIC9GD	IIIC9LD	IIIC9PD	IIIC9AZ	IIIC9GZ	IIIC9LZ	IIIC9PZ
IIIC10AD	IIIC10GD	IIIC10LD	IIIC10PD	IIIC10AZ	IIIC10GZ	IIIC10LZ	IIIC10PZ
IIIC11AD	IIIC11GD	IIIC11LD	IIIC11PD	IIIC11AZ	IIIC11GZ	IIIC11LZ	IIIC11PZ
IIIC12AD	IIIC12GD	IIIC12LD	IIIC12PD	IIIC12AZ	IIIC12GZ	IIIC12LZ	IIIC12PZ
IIIH1AD	IIIH1GD	IIIH1LD	IIIH1PD	IIIH1AZ	IIIH1GZ	IIIH1LZ	IIIH1PZ
IIIH2AD	IIIH2GD	IIIH2LD	IIIH2PD	IIIH2AZ	IIIH2GZ	IIIH2LZ	IIIH2PZ
IIIH3AD	IIIH3GD	IIIH3LD	IIIH3PD	IIIH3AZ	IIIH3GZ	IIIH3LZ	IIIH3PZ
IIIH4AD	IIIH4GD	IIIH4LD	IIIH4PD	IIIH4AZ	IIIH4GZ	IIIH4LZ	IIIH4PZ

3.3. Preparação das amostras

3.3.1. Preparação das amostras referência

Nas amostras referência, foi cortado um fragmento de cada zaragatoa (*TRIPLE-HEAD CEP SWAB, FITZCO*) e colocado em tubos de 2mL (*Eppendorf*).

3.3.2. Preparação das amostras problema

Antes de se proceder à recolha de material biológico dos tecidos, foi utilizada uma luz forense (*Crime-lite™ C2, Mason Vactron*), que emite fluorescência com comprimento de onda de 400-430nm quando se faz incidir em manchas de sémen (Figura 3), de forma a possibilitar uma melhor visualização das mesmas.



Figura 3 Luz forense (*Crime-lite™ C2, Mason Vactron*) e óculos protetores.

As manchas de sémen foram delimitadas com um marcador preto em cada um dos tecidos, para facilitar a localização da colheita do material para posterior extração de DNA. A recolha do material foi realizada recorrendo a dois métodos:

a) foi cortada uma pequena secção dentro das zonas delimitadas e colocada em tubos de 2mL devidamente identificados (*Eppendorf*). Nos tecidos onde não foi possível localizar mancha, nem a olho nu nem com recurso à luz forense, foi cortada uma pequena secção na zona que se achou mais suspeita ou provável de se encontrar a mancha;



Figura 4 Fotografias do tecido de poliéster, já cortado, sem incidência de luz UV (1 - manchas de sémen quase impercetíveis) e com incidência de luz UV (2 - manchas de sémen bem visíveis).

b) foi utilizada uma zaragatoa de algodão humedecida com água estéril (*Collection Swab Viscose, Bioplaslab*) para fazer a recolha do material biológico da mancha para análise. A recolha foi feita friccionando e rodando múltiplas vezes a ponta de algodão na mancha. Nos tecidos onde não foi possível localizar mancha, nem a olho nu nem com recurso à luz forense, foi friccionada uma zaragatoa humedecida por todo o tecido. Por fim foi cortada a extremidade da ponta de algodão e colocada em tubos de 2mL (*Eppendorf*) devidamente identificados.

3.4. Extração de DNA

3.4.1. Extração de DNA pelo método de *Chelex*[®]

Este método permite obter de um modo simples, rápido e económico quantidades significativas de DNA. No fim desta metodologia é possível obter DNA desnaturado e em cadeia simples.

Para a preparação da solução *Chelex* a 5% foram adicionados 5g de *Chelex*[®] 100 sodium form 50-100 mesh (*Sigma*), a 100mL de água estéril *nuclease free*.

3.4.2. Procedimento

Foi adicionado 1mL de água desionizada e autoclavada em cada tubo, que permaneceram 30 minutos à temperatura ambiente. Os tubos foram agitados durante 5-10 segundos e centrifugados a 1200 rpm durante 3 minutos (*Heraeus™ Pico™ 21 Microcentrifuge*). Foi descartado 970µl de sobrenadante de cada amostra, deixando cerca de 30µl no tubo. De seguida foi adicionado 170µl de *Chelex*[®] a 5% (solução homogeneizada) a cada amostra e colocado no *Thermomixer® Comfort (Eppendorf)* a 56°C, durante 30 minutos. Seguidamente foi acionada a agitação durante 5-10 segundos e foram colocados a 100°C no termobloco (*QBD, Grant*) durante 8 minutos. Por fim os tubos foram armazenados no congelador a -18°C em suporte identificado.

3.5. Quantificação de DNA

As amostras problema foram quantificadas com recurso ao *kit Quantifiler® Trio (Applied Biosystems, AB)* de modo a determinar as concentrações de DNA (*Small Autosomal* e Y) presentes e ser possível adequar a quantidade de cada amostra problema a utilizar no processo de amplificação. Este *kit* foi concebido para quantificar simultaneamente a quantidade total de DNA humano e DNA humano masculino

amplificável numa amostra e permite perceber a proporção de DNA feminino/masculino nos casos de AS.

O processamento das amostras para quantificação foi feito em câmaras UV (Aura PCR) em ambiente descontaminado. Esta técnica necessita de uma calibração através de uma curva padrão de concentrações. Para isso foi feita uma diluição em série onde foram utilizados cinco tubos. No primeiro foi misturado 10µL *buffer* (*Quantifiler® THP DNA Dilution Buffer*, AB) com 10µL de *DNA Standard* (*Quantifiler® THP DNA Standard*, AB), no segundo, terceiro, quarto e quinto tubos foi colocado 90µL de *buffer* em cada. Para realizar esta diluição em série foi colocado 10µL da mistura do primeiro tubo no segundo tubo, depois 10 µL do segundo tubo no terceiro tubo, e assim sucessivamente até ao quinto tubo (Figura 5), vortexando entre cada pipetagem.

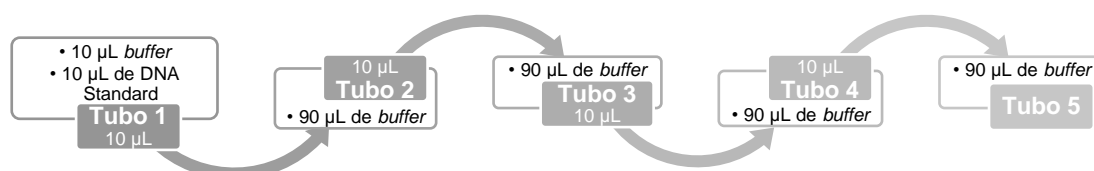


Figura 5 Diluição em série para a curva padrão necessária para a quantificação de DNA.

Após a diluição em série estar concluída, foi utilizada uma placa *MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate* (AB) onde em cada poço foi adicionado 10µL de *Quantifiler® THP PCR Reaction Mix* (AB) e 8µL de *Quantifiler® Trio Primer Mix* (AB). Foi colocado 2µL de cada amostra diluída de *DNA Standard* para a criação da curva padrão nos 5 primeiros poços da primeira e da segunda coluna, como sugerido pelo fabricante. Nos restantes poços foi colocado 2µL de cada amostra a quantificar. Por fim, a placa foi selada com *MicroAmp® Optical Adhesive Film* (AB), centrifugada a 1000 rpm durante 2 minutos (*Centrifuge 5810, Eppendorf*), e as amostras foram quantificadas com recurso ao aparelho *7500 Real-Time PCR System* (AB).

3.6. Amplificação de DNA

Foi realizada a amplificação das amostras de referência com recurso ao *kit AmpF_{STR}® MiniFiler™* (AB) para obtenção dos perfis genéticos autossómicos, e com o *kit Yfiler™ Plus PCR* (AB) nas amostras de todos os voluntários do sexo masculinos, para obtenção dos haplótipos do cromossoma Y, para posteriores comparações.

Todas as amostras problema foram amplificadas recorrendo ao *kit AmpF_{STR}® MiniFiler™* (AB) de forma a analisar os alelos presentes nos marcadores autossómicos. Nos casos onde não foi possível determinar perfis, foi também efetuada a amplificação

com o *kit Yfiler® Plus PCR* de forma a obter um haplótipo do cromossoma Y. Também foram selecionadas cinco amostras problema para amplificar com o *kit Investigator Argus X-12 Q*, o qual apresenta uma química resistente a inibidores e um sensor interno de qualidade. As quantidades de amostra problema utilizadas (Anexo 1, 2 e 3) para a amplificação foram adaptadas consoante os resultados anteriormente obtidos na quantificação de DNA autossómico e do Y

3.6.1. *Kit de amplificação AmpF_{STR}® MiniFiler™*

Este *kit* permite a amplificação em *multiplex* de 8 marcadores autossómicos (D13S317, D7S820, D2S1338, D21S11, D16S539, D18S51, CSF1PO e FGA) e um fragmento do gene da Amelogenina.

O processamento das amostras para amplificação decorreu numa câmara UV (aura PCR) em ambiente descontaminado. Em cada tubo de amplificação (*MicroAmp® Reaction Tubes*, AB) foi adicionado 10µL de *Master Mix*, 5µL de *Primer Set* e até 10µL de amostra perfazendo o volume final de 25µL com água *nuclease free*. As quantidades utilizadas foram ajustadas e otimizadas para metade das sugeridas pelo fabricante. No controlo positivo foi adicionado 10µL de controlo positivo (*Control DNA 007*), como sugerido pelo fabricante, e no controlo negativo foi adicionado 10µL de água. Por fim os tubos foram fechados com *MicroAmp® Caps* (AB) e colocados no GeneAmp® PCR System 9700 (AB) para se proceder à amplificação (Tabela III).

Tabela III Ciclo da PCR do *AmpF_{STR}® MiniFiler™* (AB).

Componente	Tempo	Número de ciclos
95°C	11 minuto	Hold
94°C	20 segundos	30 ciclos
59°C	2 minutos	
72°C	1 minuto	Hold
60°C	45 minutos	Hold
4°C	∞	Hold

3.6.2. *Kit de amplificação Yfiler® Plus PCR*

Este *kit* permite a amplificação em *multiplex* de 27 marcadores do cromossoma Y (DYS576, DYS389I, DYS635, DYS389II, DYS627, DYS460, DYS458, DYS19, YGATAH4, DYS448, DYS391, DYS456, DYS390, DYS438, DYS392, DYS518, DYS570, DYS437, DYS385, DYS449, DYS393, DYS439, DYS481, DYF387S1, DYS533).

O processamento das amostras para amplificação foi feito em câmaras UV (Aura PCR), em ambiente descontaminado. Em cada tubo de amplificação (*MicroAmp[®] Reaction Tubes*, AB) foi adicionado 5µL de *Master Mix*, 2,5µL de *Primer Pair Mix* e 4,5µL de H₂O desionizada. As quantidades utilizadas foram ajustadas e otimizadas para metade das sugeridas pelo fabricante. Foi adicionado até 5µL de amostra, no controlo positivo foi adicionado 1µL de controlo positivo (*Control DNA 007*), como sugerido pelo fabricante, e no controlo negativo foi adicionado 1µL de água. Por fim os tubos foram fechados com *MicroAmp[®] Caps* (12 caps/strip) (AB) e colocados no GeneAmp[®] PCR System 9700 (AB) para se proceder à amplificação (Tabela IV).

Tabela IV Ciclo da PCR do *Yfiler[™] Plus* (AB).

Componente	Tempo	Número de ciclos
95°C	1 minuto	Hold
94°C	4 segundos	30 ciclos
61,5°C	1 minuto	
60°C	22 minutos	Hold
4°C	∞	Hold

3.6.3. Kit de amplificação *Investigator Argus X-12 QS*

Este *kit* permite a amplificação em *multiplex* de 12 marcadores do cromossoma X (Amelogenina, DXS7132, DXS7423, DXS8378, DXS10074, DXS10079, DXS10101, DXS10103, DXS10134, DXS10135, DXS10146, DXS10148 e HPRTB). Possui ainda um sistema de controlo interno da PCR, *quality sensor*, que permite obter informações sobre a eficiência do mesmo (se a amostra está degradada, inibida, entre outras informações), para além de possuir uma tecnologia da PCR de *fast-cycling* (PCR em 80 minutos) e uma química resistente a inibidores. Por apresentar estas características, este *kit* foi utilizado em 5 amostras nas quais a amplificação com o *kit AmpF_{STR}[®] MiniFiler[™]* (AB) não ocorreu com sucesso, desta forma tentando obter mais informações sobre as condições da amostra.

O tratamento das amostras para amplificação foi feito em câmaras UV (Aura PCR) em ambiente descontaminado. Em cada tubo de amplificação (*MicroAmp[®] Reaction Tubes*, AB) foi adicionado 3,75µL de *Fast Reaction Mix 2.0*, 1,25µL de *Primer Mix Argus X-12 QS* e 6,5µL de água *nuclease free*. Foi adicionado até 7.5µL de amostra, perfazendo o volume com água *nuclease free*. As quantidades utilizadas foram ajustadas e otimizadas para metade das sugeridas pelo fabricante. No controlo positivo foi adicionado 5µL de controlo positivo (*Control DNA 9947A*) e 2.5µL de água *nuclease*

free, e no controlo negativo foi adicionado 7,5µL de água *nuclease free*. Por fim os tubos foram fechados com *MicroAmp® Caps* (12 caps/strip) (AB) e colocados no GeneAmp® PCR System 9700 (AB) para se proceder à amplificação (Tabela V).

Tabela V Ciclo da PCR do *Investigator Argus X-12 QS*.

Componente	Tempo	Número de ciclos
98°C	1 minuto	3 ciclos
61°C	100 segundos	
72°C	5 segundos	
96°C	10 segundos	27 ciclos
61°C	100 segundos	
72°C	5 segundos	
68°C	2 minutos	Hold
10°C	∞	Hold

3.7. Eletroforese capilar

3.7.1. *Kit AmpF[®]STR® MiniFiler™*

Em cada poço do *MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate* foi colocado 12,5µL de *Hi-Di™ formamide*, 0,5µL de *size standard (GeneScan™ 500 LIZ™)* e 1µL de amplificado. Para o poço correspondente ao *allelic ladder*, foi colocado 1µL deste, específico do *kit AmpF[®]STR® MiniFiler™* (AB). Posteriormente foi realizada uma desnaturação durante 3 minutos num termociclador GeneAmp® PCR Systems 9700 (AB) a 95°C, seguida de uma eletroforese capilar com recurso ao aparelho Genetic Analyzer 3500 (AB).

3.7.2. *Kit Yfiler® Plus PCR*

Em cada poço do *MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate* foi colocado 9,6µL de *Hi-Di™ formamide*, 0,4µL de *size standard (GeneScan™ 600 LIZ®)* e 1µL de amplificado. Para o poço correspondente ao *allelic ladder*, foi colocado 1µL deste, específico do *kit* amplificação *Yfiler® Plus PCR* (AB). Posteriormente foi realizada uma desnaturação durante 3 minutos num termociclador GeneAmp® PCR Systems 9700 (AB) a 95°C, seguida de uma eletroforese capilar com recurso ao aparelho Genetic Analyzer 3500 (AB).

3.7.3. *Kit Investigator Argus X-12 QS*

Em cada poço do *MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate* foi colocado 12,5µL de *Hi-Di™ formamide*, 0,5µL de *size standard* (DNA size standard 550 (BTO)) e 1µL de amplificado. Para o poço correspondente ao *allelic ladder*, foi colocado 1µL deste, específico do *kit Investigator Argus X-12 QS*. Posteriormente foi realizada uma desnaturação durante 3 minutos num termociclador *GeneAmp® PCR Systems 9700* (AB) a 95°C, seguida de uma eletroforese capilar com recurso ao aparelho *Genetic Analyzer 3500* (AB).

3.8. Análise dos perfis de DNA

Os eletroferogramas foram analisados utilizando o *software Genemapper ID-X V1.2* de forma a determinar os perfis presentes em cada amostra. Todos os perfis genéticos das amostras referência foram analisados com um limite de amplitude dos picos de 100 *relative fluorescent units* (rfu) para as quatro as fluorescências. Os perfis obtidos das amostras problema foram analisados com um limite de amplitude dos picos de 50 rfu para todas as fluorescências.

3.9. Análise de Resultados

3.9.1. Análise estatística

Foram realizados testes estatísticos de modo a verificar se existem diferenças significativas entre os dois métodos de recolha (direto ou zaragatoa) especificamente na qualidade dos perfis genéticos masculinos obtidos e na concentração de DNA recolhida.

Uma vez que as amostras em estudo apresentam uma dimensão pequena e uma distribuição assimétrica, foi utilizado o teste não paramétrico *Wilcoxon*. O nível de significância utilizado foi de 0,05. Para descrever as amostras foi utilizada a média, desvio padrão (DP) e a mediana. A análise estatística foi realizada através do programa estatístico *SPSS*.

3.10. Teste orientativo

3.10.1. *SERATEC® PSA SEMIQUANT*

Os tecidos nos quais não foi possível identificar com a luz forense manchas de sêmen evidentes, foram submetidos a um teste orientativo de deteção de PSA. Para o

teste foi friccionada uma zaragatoa humedecida por todo o tecido, em ambos os lados. Foi cortada a extremidade de algodão da zaragatoa para um tubo de 2 mL (Eppendorf) e adicionado 1mL de *buffer*. Após 2 horas, o tubo foi centrifugado a 13000 rpm durante 1 minuto (*Heraeus™ Pico™ 21 Microcentrifuge*). De seguida, foram colocadas três gotas de sobrenadante no *sample well* do teste e após dez minutos foi visualizado o resultado.

Para os testes serem considerados válidos, é necessário que a *Control Line* (C) e a *Internal Standard* surjam coradas. A presença de uma linha de coloração rosa no *Test Result Line* (T) é indicativa da presença de fluido seminal. Caso esta não apareça, é indicativo da ausência de fluido seminal na amostra.

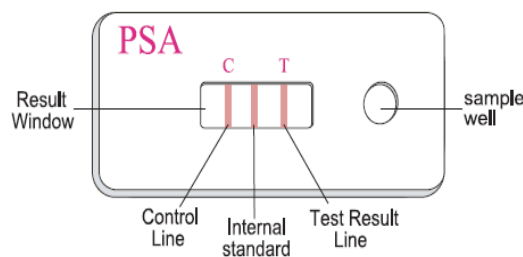


Figura 6 Imagem ilustrativa do teste SERATEC® PSA SEMIQUANT (Fonte: SERATEC® PSA SEMIQUANT user instructions).

4. Resultados

4.1. Preparação das amostras problema

Aquando da identificação das manchas de sémen nos tecidos, existiu a necessidade da utilização uma fonte de luz UV (*Crime-lite™ C2*, *Mason Vactron*), de forma a facilitar a delimitação das zonas. Nos tecidos poliéster, no acrílico e na lã a identificação das manchas de sémen a olho nu foi difícil, apesar de em alguns casos ser possível esta identificação. Na ganga, por outro lado, em grande parte dos tecidos foi possível identificar as manchas a olho nu, sem auxilio da luz forense.



Figura 7 Fotografia à luz natural dos tecidos de ganga com manchas de sémen já delimitadas.

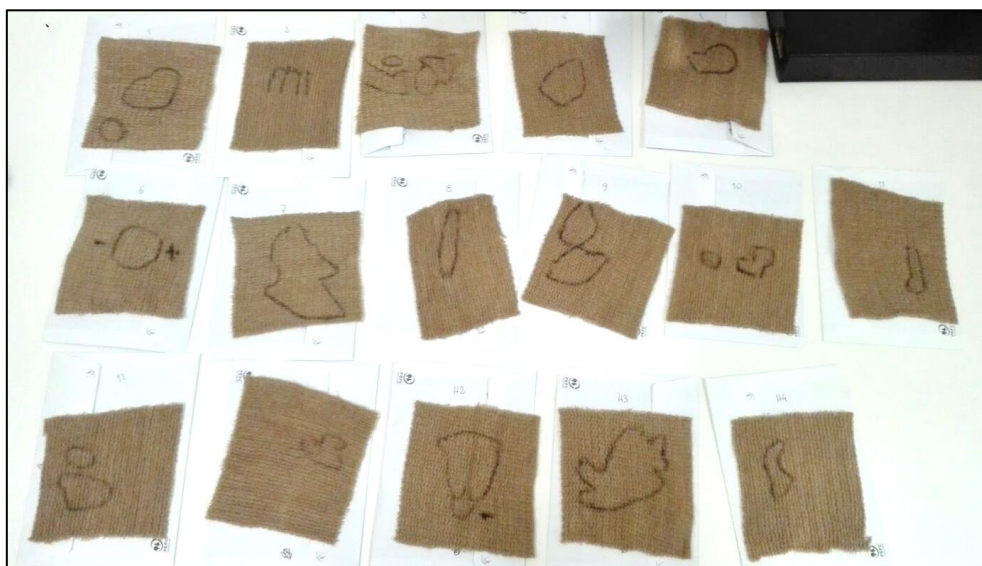


Figura 8 Fotografia à luz natural dos tecidos de acrílico com manchas de sémen já delimitadas.

A identificação das manchas de sémen no poliéster, na lã e no acrílico, com recurso à luz forense, foi, de um modo geral, simples (Figuras 9, 10 e 11), com exceção em três dos tecidos de lã (casal 11, casal 12 e homem 4), que por apresentarem uma coloração vermelha um pouco mais “fluorescente” do que os restantes, interferiu com a luz emitida não permitindo a visualização da mancha de sémen (Figura 12). Já nas amostras de ganga (Figura 13), a identificação das manchas com recurso à luz foi praticamente inexecutável, neste caso a identificação foi realizada a olho nu. De um modo geral não foi possível identificar o posicionamento das manchas de sémen nos três tecidos de lã vermelho “fluorescente” e em dois tecidos de ganga.



Figura 9 Fotografia com luz forense de uma mancha de sémen no poliéster.

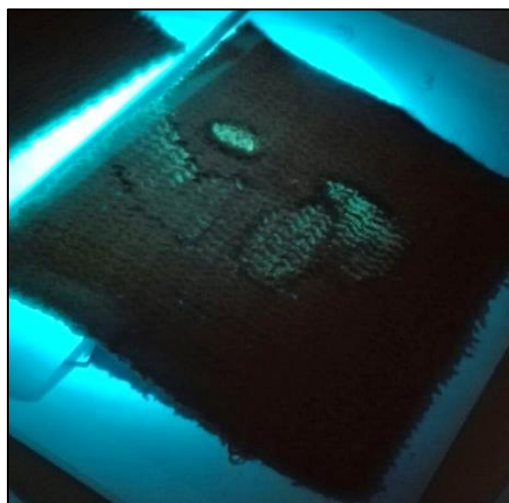


Figura 10 Fotografia com luz forense de uma mancha de sémen no acrílico.

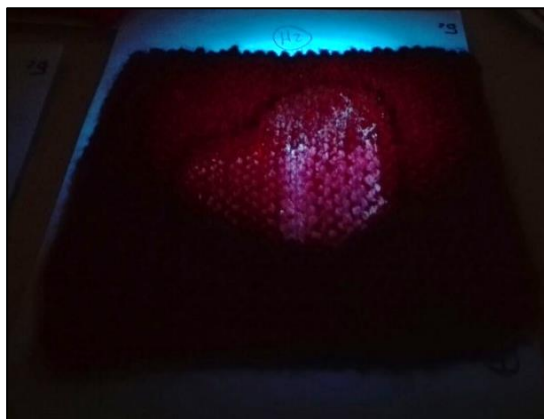


Figura 11 Fotografia com luz forense de uma mancha de sémen na lã.

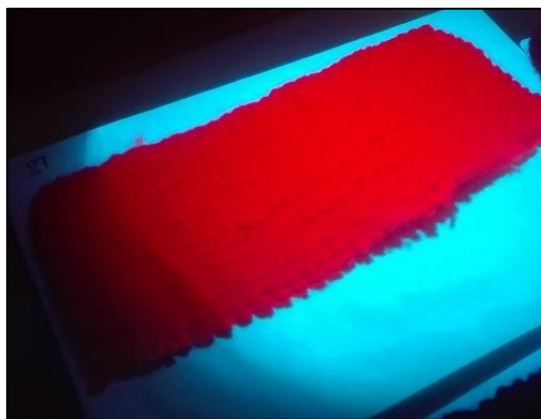


Figura 12 Fotografia com luz forense de um tecido de lã de cor vermelho “fluorescente”.

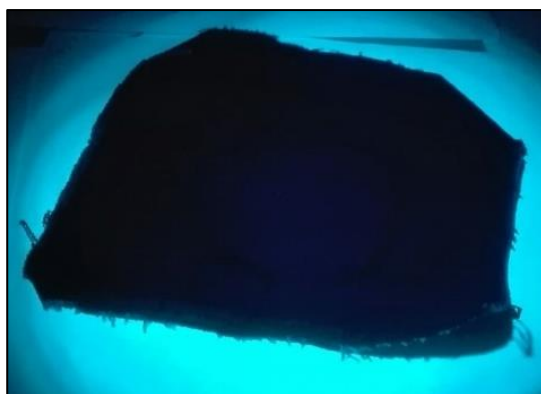


Figura 13 Fotografia com luz forense de um tecido ganga.

4.2. Quantificação das amostras problema

As amostras problema foram extraídas e quantificadas através do *kit Quantifiler® Trio* (AB). Os valores das concentrações de DNA *Small Autosomal* (SA) e do Y obtidos foram organizados na Tabela VI.

Tabela VI Resultados da quantificação de DNA (Y e SA) das amostras problema fornecidas pelos voluntários em cada tecido e técnica utilizada Legenda: AD - tecido acrílico com método direto; AZ - tecido acrílico com método zaratagoa; PD - tecido poliéster com método direto; PZ - tecido poliéster com método zaratagoa.; LD - tecido lã com método direto; LZ - tecido lã com método zaragatoa; GD - tecido ganga com método direto e GZ - tecido ganga com método com zaragatoa.

	Concentração de DNA (SA) (ng/μL)								Concentração de DNA (Y) (ng/μL)							
	AD	AZ	PD	PZ	LD	LZ	GD	GZ	AD	AZ	PD	PZ	LD	LZ	GD	GZ
C1	0,44	0,33	0,54	0,04	0,15	0,09	0,04	0,01	0,38	0,20	0,44	0,03	0,12	0,07	0,03	0,01
C2	0,05	0,00	0,02	0,00	0,01	0,01	0,01	0,00	0,05	0,00	0,02	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00
C3	1,48	1,82	1,47	0,04	12,44	9,19	0,07	0,03	1,17	1,29	0,69	0,01	13,17	9,25	0,05	0,02
C4	0,06	0,06	0,34	0,01	0,14	0,07	0,00	0,00	0,05	0,04	0,38	0,00	0,12	0,07	0,00	0,00
C5	0,29	0,19	0,24	0,08	0,94	0,27	0,13	0,00	0,34	0,22	0,25	0,06	0,96	0,31	0,17	0,00
C6	0,54	0,91	0,90	0,16	1,98	0,86	1,10	0,00	0,44	0,81	0,67	0,14	1,96	1,01	0,98	0,00
C7	0,29	0,63	1,22	0,07	0,53	0,14	0,32	0,02	0,17	0,49	1,19	0,04	0,11	0,11	0,07	0,01
C8	0,06	0,08	0,60	0,01	0,15	0,10	0,00	0,00	0,03	0,05	0,29	0,00	0,09	0,04	0,00	0,00
C9	0,11	0,22	0,59	0,02	0,14	0,09	0,00	0,00	0,09	0,20	0,65	0,02	0,12	0,10	0,00	0,00
C10	0,11	0,06	0,26	0,01	0,03	0,01	0,04	0,00	0,04	0,02	0,09	0,00	0,01	0,01	0,02	0,00
C11	0,20	0,24	1,17	0,10	0,78	0,02	0,04	0,04	0,08	0,09	0,86	0,05	0,54	0,02	0,02	0,02
C12	0,03	0,01	0,06	0,00	0,05	0,01	0,01	0,00	0,02	0,01	0,05	0,00	0,03	0,00	0,01	0,00
H1	0,03	0,02	0,11	0,03	0,07	0,01	0,03	0,01	0,02	0,03	0,09	0,03	0,08	0,01	0,04	0,01
H2	0,42	1,02	0,09	0,03	0,02	0,40	0,42	0,01	0,27	0,87	0,05	0,02	0,01	0,33	0,38	0,00
H3	0,16	0,79	3,54	0,00	1,05	0,18	2,24	0,12	0,15	0,65	2,35	0,00	0,94	0,17	2,01	0,10
H4	0,21	0,03	0,36	0,04	0,23	0,00	0,03	0,01	0,14	0,02	0,33	0,04	0,20	0,00	0,04	0,01

A quantidade desejável de DNA que uma amostra deve conter para a PCR é de 0,5 ng/μL. Nas amostras problema que se afastaram deste valor, as quantidades de amostra utilizadas na PCR foram adaptadas de modo a tentar otimizar o processo de amplificação. Na amplificação com os *kits Investigator Argus X-12 QS* e *AmpFlSTR® MiniFiler™* (AB) a quantidade das amostras foi adaptada consoante o valor de SA obtido. Na amplificação com o *kit Yfiler® Plus PCR* (AB) a quantidade de amostra foi adaptada consoante a proporção dos valores de Y e SA.

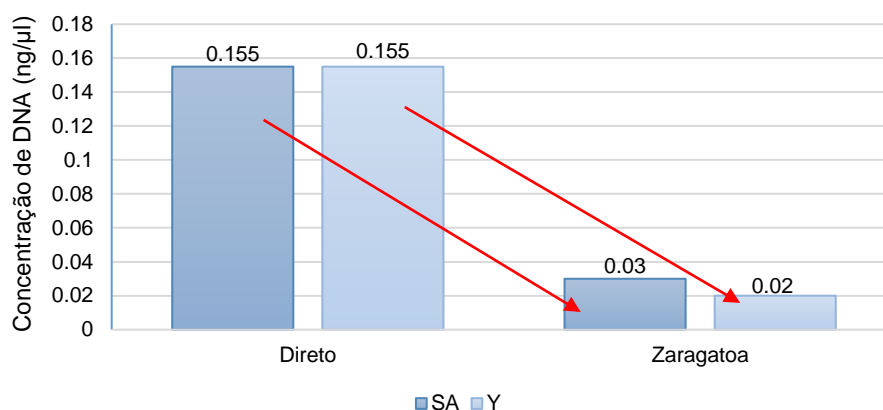


Figura 14 Gráfico com as médias gerais de concentração de DNA (SA e Y) (ng/μL) com o método da zaragatoa e direto.

É possível verificar através da Figura 14 que com a técnica de recolha diretamente do tecido foi obtida, em média, uma maior concentração de DNA (0,155 ng/μL), SA e Y, do que com a técnica da zaragatoa humedecida (SA - 0.03 ng/μL e Y - 0.02 ng/μL).

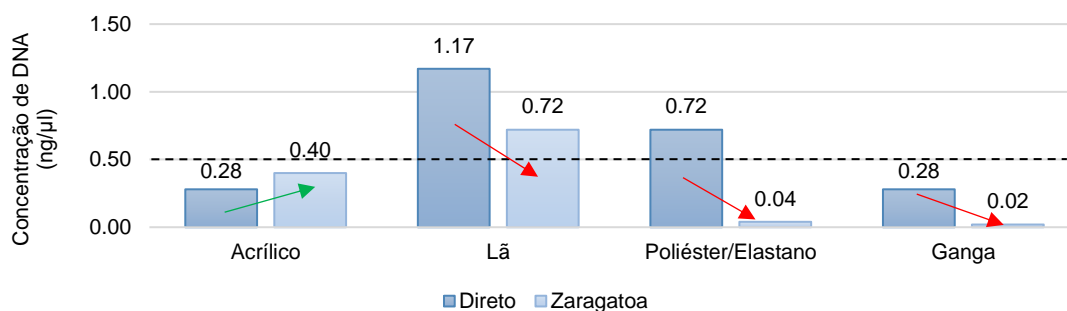


Figura 15 Gráfico com as médias da quantidade de DNA SA nos diferentes tecidos, com ambos os métodos (direto e zaragatoa). Linha a tracejado representa a concentração de DNA ideal para PCR

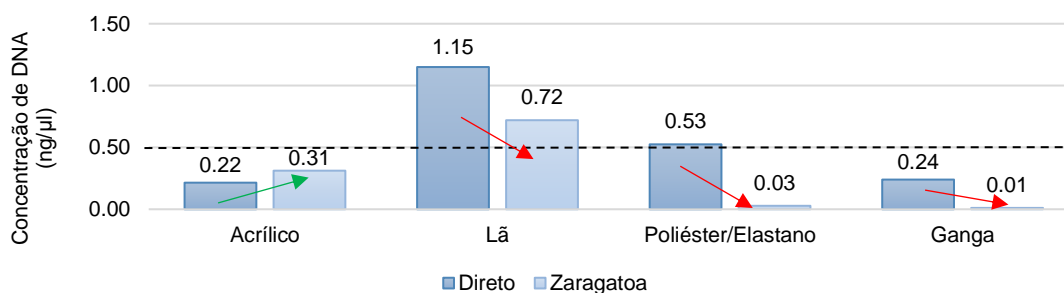


Figura 16 Gráfico da média das quantidades de DNA Y nos diferentes tecidos, com ambos os métodos (direto e zaragatoa). Linha a tracejado representa a concentração de DNA ideal para PCR.

Nas Figuras 15 e 16 é possível observar que no acrílico o método da zaragatoa permitiu a obtenção de uma maior concentração de DNA em relação ao método direto. Já nas amostras poliéster, ganga e lã a concentração de DNA esta apresentou-se mais baixa do que com o método direto.

4.2.1. Análise estatística

Foi realizada a análise estatística dos resultados obtidos na quantificação do DNA (SA e Y) entre as duas técnicas dentro de cada tipo de tecido.

Tabela VII Análise descritiva dos dados (média, DP e mediana) e teste estatístico de Wilcoxon comparando o método direto com o método zaragatoa dentro de cada tecido, relativamente à concentração de DNA (SA) obtida. Nível de significância: 0,05.

	Concentração de DNA (SA) (ng/μl)				Valor de prova (p)
	Método direto		Método zaragatoa		
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	
Lã	1,169 ± 3,053	0,1500	0,716 ± 2,270	0,090	0,004
Acrílico	0,280 ± 0,357	0,1800	0,401 ± 0,501	0,205	0,256
Ganga	0,280 ± 0,593	0,0400	0,016 ± 0,030	0,005	0,002
Poliéster	0,719 ± 0,875	0,4500	0,040 ± 0,043	0,030	< 0,001

Tabela VIII Análise descritiva dos dados (média, DP e mediana) e teste estatístico de Wilcoxon comparando o método direto com o método zaragatoa dentro de cada tecido, relativamente à concentração de DNA (Y) obtida. Nível de significância: 0,05.

	Concentração de DNA (Y) (ng/μl)				Valor de prova (p)
	Método direto		Método zaragatoa		
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	
Lã	1,154 ± 3,248	0,120	0,719 ± 2,289	0,070	,008
Acrílico	0,215 ± 0,289	0,115	0,312 ± 0,394	0,145	,338
Ganga	0,239 ± 0,534	0,035	0,011 ± 0,025	0,000	,002
Poliéster	0,525 ± 0,591	0,355	0,028 ± 0,036	0,020	< 0,001

Com o teste estatístico *Wilcoxon* (Tabelas VII e VIII) foi possível verificar que existem diferenças significativas entre os métodos de recolha relativamente à quantificação de DNA (SA e Y), nos tecidos lã, ganga e poliéster. No tecido acrílico os métodos não revelaram diferenças significativas.

4.3. Perfis genéticos

4.3.1. *Kit AmpF ℓ STR[®] MiniFiler[™]*

Todas as amostras referência e problema foram amplificadas com o *kit AmpF ℓ STR[®] MiniFiler[™]* (AB) de forma a obter os perfis genéticos. Nas amostras problema, no caso dos casais voluntários, parte dos perfis genéticos obtidos na análise dos diferentes tecidos apresentaram-se como misturas mulher/homem. No caso dos voluntários homens, como é de esperar, os perfis obtidos não apresentaram mistura.

Uma vez que este estudo tem como um dos objetivos simular casos de AS, nas amostras problema foi tida em consideração a presença ou ausência dos alelos pertencentes ao indivíduo do sexo masculino, nos diferentes marcadores genéticos. Para isso, os perfis obtidos das amostras problema dos voluntários em casal e dos voluntários homem, foram comparados com os perfis de referência masculinos, e os alelos do voluntário masculino foram categorizados consoante a sua presença ou ausência dos perfis.

Os perfis genéticos das amostras problema foram classificados como “completos” (Anexo 8), “incompletos” (Anexo 9) ou “sem perfil” (Anexo 10) consoante o número de marcadores amplificados do voluntário masculino. Os “marcadores completos” são aqueles que apresentaram amplificação total do(s) alelo(s), os “marcadores incompletos” são aqueles que apresentaram apenas amplificação de um dos alelos (em caso de heterozigotia) e “não amplificado” são aqueles que não apresentaram alelos. Seguidamente estão descritos os critérios utilizados na classificação:

- 1) **Perfil completo:** todos os marcadores genéticos do voluntário masculino amplificados com sucesso;
- 2) **Perfil incompleto:** três ou menos marcadores não amplificados; quatro ou menos marcadores incompletos;
 - Combinação de três ou menos marcadores incompletos e um não amplificado;
 - Combinação de um marcador incompleto com dois ou menos marcadores não amplificados.
- 3) **Sem perfil:** todos os perfis com mais de três marcadores não amplificados;
 - Combinação três marcadores não amplificados e um marcador incompleto é considerado sem perfil.

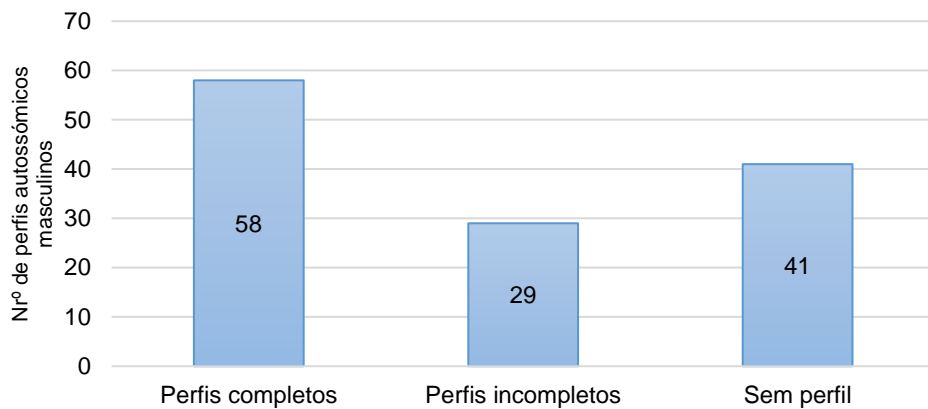


Figura 17 Gráfico com o número total de perfis masculinos completos, incompleto e sem perfil obtidos num total de 128 perfis analisados com o *kit AmpF[®]STR[®] MiniFiler[™]* (AB).

Na Figura 17 é possível observar que no total foram obtidas 58 (~45%) amostras com perfis completos, 29 (~22%) com perfis incompletos e 41 (32%) sem perfil.

No caso dos perfis genéticos obtidos a partir das amostras fornecidas pelos casais voluntários, existia a possibilidade de estes apresentarem uma mistura mulher/homem, o que poderia interferir com a obtenção do perfil masculino contido nessa mistura. No entanto, a tendência mostrou-se similar para ambos os tipos de voluntários (casal ou homem), pelo que se optou por construir um gráfico geral (Figura 18). Deste modo foi possível obter uma perspetiva geral das percentagens de “perfis completos”, “perfis incompletos” e “sem perfil” obtidos, em cada tipo de tecido e método de recolha utilizado.

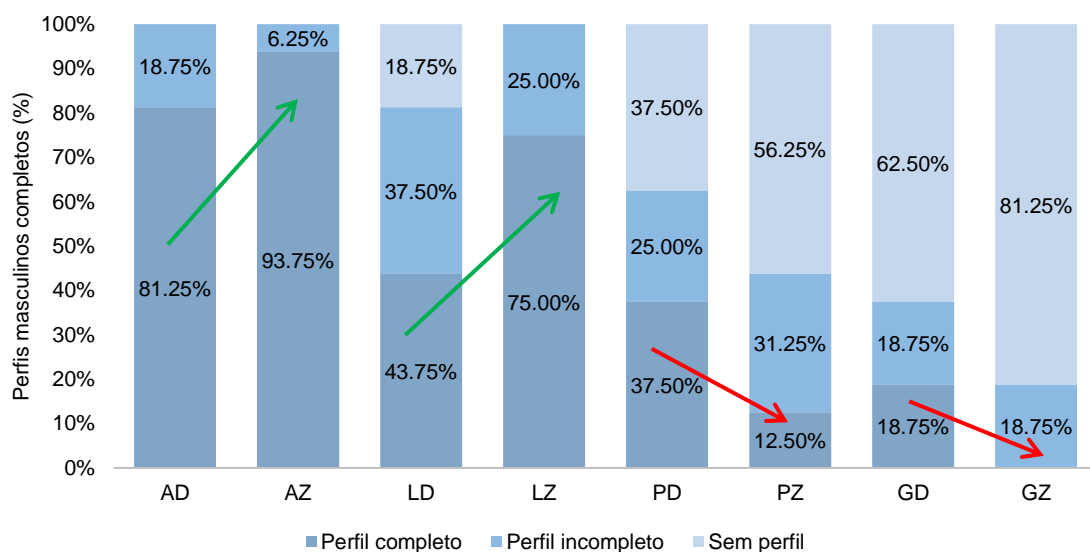


Figura 18 Gráfico geral com a percentagem de perfis autossômicos masculinos completos, incompletos e sem perfil obtidos a partir das amostras problema fornecidas por todos os voluntários, tanto casais como masculinos, nos diferentes tecidos e com ambas as técnicas, com recurso ao o *kit AmpF[®]STR[®] MiniFiler[™]* (AB). Para cada grupo a dimensão da amostra é de N=16

Através do gráfico da Figura 18 é possível observar um aumento do número de perfis masculinos “completos” com o uso do método zaragatoa, relativamente ao método direto, e uma consequente diminuição do número de perfis “incompletos” e “sem perfil”, nos tecidos acrílico e lã. Nos tecidos poliéster e ganga houve uma diminuição dos perfis masculinos “completos”.

4.3.1.1. Análise estatística

Foi realizada uma análise estatística relativamente à capacidade de obtenção de perfis autossómicos masculinos nas amostras problema. Neste caso, foi contabilizado o número de marcadores genéticos que apresentaram amplificação com sucesso do(s) alelo(s) do perfil genético do indivíduo masculino, tanto nas amostras problema fornecidas pelos voluntários em casal como pelos voluntários masculinos. Os valores em cada perfil variaram entre zero e nove, uma vez que o *kit AmpF_LSTR® MiniFiler™* (AB) apresenta um total de nove marcadores.

Nesta análise apenas foram contabilizados os marcadores genéticos amplificados na totalidade, ou seja, no caso de o perfil masculino apresentar heterozigotia num determinado marcador, se estiver presente apenas um dos alelos, esse marcador não foi contabilizado como tendo amplificado.

Tabela IX Análise descritiva dos dados (média, DP e mediana) e teste estatístico de Wilcoxon comparando o método direto com o método zaragatoa dentro de cada tecido, relativamente à capacidade de obtenção de perfis autossómicos masculinos. Nível de significância: 0,05.

	Número de marcadores do perfil masculino amplificados com sucesso (0~9)				Valor de prova (p)
	Método direto		Método zaragatoa		
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	
Lã	6,750 ± 3,044	7,500	8,688 ± 0,605	9,000	0,015
Acrílico	8,688 ± 0,704	9,000	8,938 ± 0,250	9,000	0,157
Ganga	3,438 ± 3,651	2,000	1,875 ± 2,778	0,000	0,043
Poliéster	5,438 ± 3,932	7,500	3,000 ± 3,425	1,500	0,032

Com o teste estatístico Wilcoxon (Tabela IX) foi possível verificar que existem diferenças significativas entre os métodos de recolha direto e zaragatoa, relativamente à capacidade de obtenção de perfis masculinos, nos tecidos lã, ganga e poliéster. No tecido acrílico não houveram diferenças significativas.

4.3.2. Kit Yfiler® Plus PCR

Das 128 amostras problema analisadas com o *kit AmpF_{STR}® MiniFiler™* (AB), 41 delas não apresentaram perfil masculino. Desse modo, essas 41 amostras foram amplificadas com recurso ao *kit Yfiler® Plus PCR* (AB) de forma a tentar obter os haplótipos do cromossoma Y. As amostras problemas analisadas com este *kit* foram:

Voluntários masculinos (N=10): IIIH1GD, IIIH1GZ, IIIH2GZ, IIIH2LD, IIIH2PD, IIIH2PZ, IIIH3PZ, IIIH4GZ, IIIH4PD e IIIH4PZ;

Casais voluntários (N=31): IIIC1GD, IIIC1GZ, IIIC1PZ, IIIC2GD, IIIC2GZ, IIIC2LD, IIIC2PD, IIIC2PZ, IIIC3GD, IIIC4GD, IIIC4GZ, IIIC4PZ, IIIC5GD, IIIC5GZ, IIIC5PD, IIIC6GZ, IIIC7GD, IIIC7GZ, IIIC8GD, IIIC8GZ, IIIC8PD, IIIC8PZ, IIIC9GD e IIIC9GZ, IIIC10GD, IIIC10GZ, IIIC10LD, IIIC10PD, IIIC10PZ, IIIC12GZ e IIIC12PZ.

Os haplótipos do cromossoma Y das 41 amostras problema foram classificados como “haplótipo completo” (Anexo 11) ou “sem haplótipo” (Anexo 12) consoante o número de marcadores amplificados. Os haplótipos completos são constituídos no mínimo por 9 loci (DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS385a/b), que estão presentes em todos os *kits* Y-STR usados nos laboratórios forenses (Purps et al., 2014)

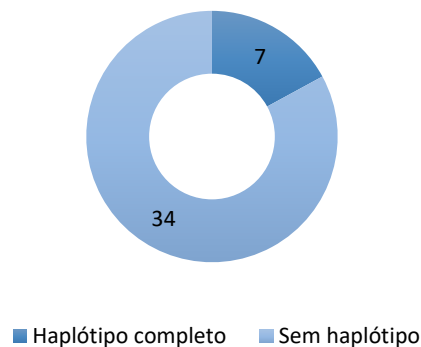


Figura 19 Gráfico circular com o numero total de haplótipos do cromossoma Y completos, incompleto e sem perfil obtidos a partir da análise de 41 amostras problema fornecidas pelos voluntários (casais ou masculinos) analisadas com o *kit Yfiler® Plus PCR* (AB).

Na Figura 19 é possível observar que em 41 amostras analisadas obtiveram-se 6 (~17%) haplótipos do Y completos e 35 (~83%) sem haplótipo.

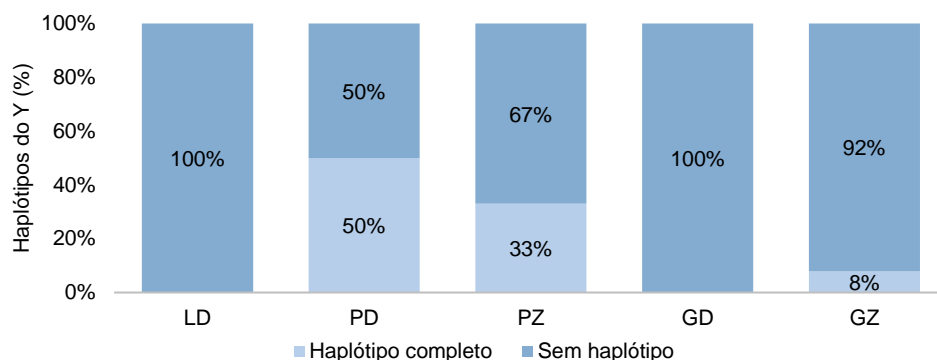


Figura 20 Gráfico com o número total de haplótipos do cromossoma Y completos, incompletos e sem perfil obtidos num total de 41 perfis analisados com recurso ao kit *Yfiler® Plus PCR* (AB).

É possível verificar através do gráfico da Figura 20 que não foi possível obter haplótipos do cromossoma Y completos na lã. Na ganga, foi apenas possível obter haplótipos completos em 8% das amostras com o método da zaragatoa. No poliéster foi possível obter haplótipos completos em 50% das amostras problema recolhidas com o método direto e em 33% das amostras recolhidas com o método da zaragatoa.

4.3.3. Kit Investigator Argus X-12 QS

Foram escolhidas 5 amostras problema, dos tecidos poliéster e ganga, nas quais não foi possível obter perfil masculino com o kit *AmpF_{STR}® MiniFiler™* (AB). Em duas dessas amostras foi obtido o haplótipo mínimo do cromossoma Y com o kit *Yfiler® Plus PCR* (AB) e em três não se obteve. Todas as 5 amostras foram amplificadas com sucesso (Anexo 13) com o kit *Investigator Argus X-12 QS* (Tabela X).

Tabela X Obtenção de haplótipo X de 5 amostras nos kits de amplificação *AmpF_{STR}® MiniFiler™* (AB), *Yfiler® Plus PCR* (AB) e *Investigator Argus X-12 QS*.

	<i>AmpF_{STR}® MiniFiler™</i> (AB)	<i>Yfiler® Plus PCR</i> (AB)	<i>Investigator Argus X-12 QS</i>
IIIH4PD	Sem perfil	Completo	Completo
IIIC5PD	Sem perfil	Completo	Completo
IIIC5GD	Sem perfil	Sem haplótipo	Completo
IIIC7GD	Sem perfil	Sem haplótipo	Completo
IIIH1GZ	Sem perfil	Sem haplótipo	Completo

4.4. Teste orientativo

4.4.1. SERATEC® PSA SEMIQUANT

Foi realizado um teste orientativo nos cinco tecidos nos quais não foi possível identificar qualquer mancha de sêmen, quer a olho nu, quer com a luz forense (casal 9 e 10 do tecido ganga e casal 11, 12 e homem 4 do tecido lã).

Com teste de detecção de PSA é possível visualizar na Figura 21 que nos testes 1, 2, 4 e 5 foi obtido um resultado positivo, enquanto que no teste 3 foi obtido um resultado negativo.



Figura 21 Resultados do teste orientativo SERATEC® PSA SEMIQUANT, C10 de cinco amostras problema (1 - C11, lã, 2 - C10, ganga, 3 - C9, ganga, 4 - H4, lã e 5 - C12, lã).

Relativamente aos perfis genéticos masculinos obtidos destas amostras pode-se verificar através da Tabela XI que no tecido que não apresentou resultados (tecido ganga, casal 9) no teste orientativo, não foi possível de todo possível obter perfil autossómico masculino. Por outro lado, nos tecidos que apresentaram resultado positivo no teste orientativo, foi obtido, pelo menos, um perfil autossómico masculino incompleto na análise (Tabela XI).

Tabela XI Resultados do teste orientativo SERATEC® PSA SEMIQUANT, C10 e dos perfis obtidos nos tecidos onde não foi possível identificar as manchas de sêmen.

		AmpFℓSTR® MiniFiler™ (AB)		SERATEC® PSA SEMIQUANT, C10
		Zaragatoa	Direto	
C9	Ganga	Sem perfil	Sem perfil	Negativo
C10	Ganga	Sem perfil	Perfil incompleto	Positivo
C11	Lã	Perfil completo	Perfil completo	Positivo
C12	Lã	Perfil incompleto	Perfil incompleto	Positivo
H4	Lã	Perfil incompleto	Perfil completo	Positivo

5. Discussão

5.1. Preparação das amostras problema e teste orientativo

A identificação das manchas de sémen nos tecidos foi realizada a olho nu e com recurso a uma luz forense, consoante o método que permitisse a melhor visualização da mancha. Na ganga em particular, não foi de todo possível visualizar manchas de sémen com recurso à luz forense, as manchas foram identificadas a olho nu, exceto em duas amostras, nas quais não foi possível identificar qualquer mancha. Nos três tecidos de lã vermelho “fluorescente” também não foi possível a visualização da mancha. Deste modo, uma vez que seria expectável que os tecidos apresentassem manchas de sémen, foi realizado um teste orientativo (*SERATEC® PSA SEMIQUANT, C10*) nos mesmos.

Neste teste orientativo, foram obtidos 4 resultados positivos e 1 negativo. O resultado negativo coincidiu com o tecido ganga do casal 9 no qual não se obteve perfil genético masculino. Os resultados positivos coincidiram com 4 amostras nas quais se obteve, pelo menos 1 perfil incompleto. Com base nestes resultados, a realização de testes orientativos em tecidos onde não se visualize de todo manchas de sémen, poderá ser importante para a posterior obtenção de perfis genéticos dos possíveis suspeitos de AS. Caso os testes orientativos indiquem a presença de PSA, torna-se muito sugestiva a presença de sémen e por isso fará sentido prosseguir com a análise.

5.2. Quantificação das amostras problema

Com base nos resultados obtidos na quantificação de DNA (SA e Y) (Figura 14) é possível observar que foi obtida uma maior concentração de DNA com o método direto do que com o método da zaragatoa, como era expectável.

No entanto, analisando os resultados de uma maneira mais individuada (Figuras 15 e 16), é possível verificar que nas amostras de acrílico houve um aumento da concentração de DNA (SA e Y) com o uso do método da zaragatoa. Relativamente aos tecidos lã, ganga e poliéster, houve uma diminuição da concentração de DNA (SA e Y) com o método de zaragatoa. Apesar disso, observando o valor da média das concentrações de DNA com o este método, é possível verificar que tanto no acrílico como na lã estes aproximaram-se mais do valor ideal para amplificação (0.5 ng/µl) do que com o método direto. Com o método da zaragatoa nos tecidos ganga e poliéster as concentrações de DNA (SA e Y) aproximaram-se de zero.

Nos tecidos de fibras com maior espaçamento, como o caso do acrílico e da lã, as manchas de sêmen não são completamente absorvidas pelo tecido, ficando estas, provavelmente, mais à superfície. Deste modo tornou-se mais fácil a realização da recolha com uma zaragatoa humedecida. A eficácia na recolha com a zaragatoa refletiu-se na diferença das médias de concentração de DNA (SA e Y) nos tecidos acrílico e lã, que apresentaram médias mais elevadas, que nos tecidos ganga e poliéster. Nestes, a recolha não se revelou eficiente, provavelmente porque apresentam fibras apertadas que absorveram o sêmen e dificultaram a recolha do mesmo com a zaragatoa.

5.2.1. Análise estatística

Através na análise estatística foi possível observar diferenças significativas na concentração de DNA (SA e Y) obtida entre os dois métodos em todos os tecidos, exceto no acrílico. Neste, a recolha com recurso a uma zaragatoa mostrou-se vantajosa não só porque foi possível obter uma maior concentração de DNA (SA e Y), mas também mais próxima da concentração ideal de PCR. Relativamente à lã, apesar das diferenças significativas entre os métodos, a média de concentração de DNA (SA e Y) obtida com recurso a uma zaragatoa aproximou-se da concentração ideal para a amplificação.

Em relação aos tecidos ganga e poliéster, as diferenças significativas entre os dois métodos enfatizam o que já foi observado (Figura 15 e 16), que as médias de concentração de DNA (SA e Y) se aproximam de zero com o método de zaragatoa.

5.3. Perfis genéticos

5.3.1. *Kit AmpF_lSTR® MiniFiler™*

Através da classificação dos perfis e da elaboração do gráfico da Figura 17 foi possível observar que em 70 (~65%) das 128 amostras problema analisadas não foi possível obter o perfil completo masculino. Na Figura 18 é possível visualizar um aumento da obtenção de perfis genéticos masculinos completos com o método da zaragatoa, relativamente ao método direto, nos tecidos lã e acrílico e uma diminuição dos mesmos nos tecidos ganga e poliéster.

Ao comparar o gráfico das Figura 15 com o gráfico da Figura 18 é possível também verificar que, apesar da concentração de DNA (SA) obtida em AD e GD serem idênticas, a percentagem de perfis genéticos masculinos completos é distinta, onde em AD se obteve 81,25% de perfis completos e em GD se obteve apenas 18,75%. O mesmo aconteceu com LZ e PD, que apresentam concentrações de DNA (SA e Y) idênticas,

mas percentagens distintas de perfis genéticos masculinos completos, onde em LZ se obteve 75% de perfis completos e em PD se obteve apenas 37,50%. No caso de LD, onde se obteve a média mais elevada de concentração de DNA (SA e Y), a percentagem de perfis completos apresentou-se baixa (43,75%) relativamente a LZ, a qual apresentou uma percentagem de 75%, apesar da concentração de DNA (SA e Y) ser menor.

Estes resultados poderão indicar que os tecidos ganga e poliéster, para além de não se mostrarem ideais para o uso do método da zaragatoa, possuam compostos que interfiram com a análise das amostras, impossibilitando a obtenção de perfis genéticos de qualidade. Por outro lado, os resultados indicam que tanto no acrílico como na lã a utilização da zaragatoa como método de recolha poderá ser vantajosa, uma vez que, provavelmente, permite a obtenção de uma amostra com menos compostos que possam interferir na análise e obtenção de perfis genéticos. Para além disso, a técnica de recolha com recurso a zaragatoa nestes tecidos não diminuiu a concentração de DNA (SA e Y) para valores ínfimos, como aconteceu na ganga e no poliéster. Inclusivamente no acrílico foi obtida uma maior média de concentração com o método da zaragatoa, quando comparada ao método direto.

5.3.1.1. Análise estatística

Através da análise estatística realizada para comparar a qualidade dos perfis autossómicos masculinos entre os diferentes métodos de recolha, foi possível verificar que houve diferenças significativas nos tecidos lã, ganga e poliéster. No acrílico não houve diferenças significativas entre os métodos, provavelmente porque com método direto obteve-se uma percentagem de perfis completos de 81,25%, demonstrado não ser um tecido tão problemático como os tecidos lã, poliéster e ganga, nos quais se obteve 43,75%, 37,50 e 18,75%, respetivamente. Ou seja, a diferença entre os dois métodos no acrílico não foi suficiente para demonstrar diferenças significativas na qualidade dos perfis, apesar de ser ter obtido com o método da zaragatoa 93,75% de perfis completos.

5.3.2. *Kit Yfiler® Plus PCR*

Através da classificação dos haplótipos e da elaboração do gráfico circular da Figura 19 é possível verificar que em 7 (~18%) das 41 amostras foi possível obter haplótipos completos do cromossoma Y.

Relativamente à obtenção dos haplótipos, é possível observar no gráfico da Figura 20 que apenas foi possível obter haplótipos completos no poliéster, com ambos os métodos, e na ganga, com o método zaragatoa. Tal, pode ser explicado pela química inerente a este *kit* em particular poder ser menos sensível aos possíveis compostos inibitórios presentes. No entanto, não foi possível obter haplótipo mínimo na ganga, com o método direto, talvez por este tecido poder apresentar outro tipo de compostos (ou em maior concentração) que impossibilitem a amplificação. Relativamente ao tecido lã, não foi possível obter haplótipo, provavelmente devido às próprias condições da amostra.

5.3.3. *Kit Investigator Argus X-12 QS*

Os resultados da amplificação com o *kit Investigator Argus X-12 QS* indicam que a química inerente a este *kit* é possivelmente mais resistente a compostos inibitórios e por isso foi possível a amplificação com sucesso das 5 amostras.

6. Conclusões

- 1º. Este trabalho demonstrou que a luz forense nem sempre é eficiente na localização de manchas de sémen e que é necessário adaptar os meios de identificação ao tipo de tecido.
- 2º. Demonstrou também que a pesquisa de PSA é uma análise importante para a orientação da investigação e da análise laboratorial.
- 3º. O método de recolha com uma zaragatoa humedecida verificou-se mais eficiente em tecidos de fibras espaçadas, pois ao diminuir a transferência de compostos inibitórios, acoplado à obtenção de quantidade de DNA ideal para a amplificação, aumenta a probabilidade de se obterem perfis genéticos válidos.
- 4º. O uso de um *kit* de amplificação do cromossoma Y, constitui uma prova importante em tribunal, não só na exclusão de suspeitos, mas também na inclusão de indivíduos aparentados pela linhagem paterna, principalmente em amostras nas quais não foi possível obter o perfil autossómico do possível perpetrador.

Em jeito de conclusão, num próximo estudo seria interessante testar não só a ganga e o poliéster, mas também outros tecidos, com *kits* de amplificação que possuam uma química mais avançada e resistente a compostos inibitórios. Seria igualmente interessante analisar outros tecidos de fibras espaçadas com o método da zaragatoa humedecida, em manchas de sémen e outros materiais biológicos (p.e. sangue, saliva, etc.), de forma a compreender se o método se revelará igualmente eficaz, como se observou neste trabalho. Deste modo será possível melhorar as técnicas de recolha e análise de vestígios em têxteis forenses, os quais podem conter evidências de DNA essenciais para o desenvolvimento de investigações criminais.

7.Referências bibliográficas

Akane, A., Matsubara, K., Nakamura, H., Takahashi, S., and Kimura, K. (1994). Identification of the Heme Compound Copurified with Deoxyribonucleic Acid (DNA) from Bloodstains, a Major Inhibitor of Polymerase Chain Reaction (PCR) Amplification. *Journal of Forensic Sciences* 39, 362-372.

Alaeddini, R. (2012). Forensic implications of PCR inhibition-A review. *Forensic Science International-Genetics* 6, 297-305.

Allard, J.E., Baird, A., Davidson, G., Jones, S., Lewis, J., McKenna, L., Weston, C., Scritrigger, D., and Teppett, G. (2007). A comparison of methods used in the UK and Ireland for the extraction and detection of semen on swabs and cloth samples. *Sci Justice* 47, 160-167.

Anderst, J. (2011). The forensic evidence *kit*. In *Child abuse and neglect Diagnosis, Treatment, and evidence*, J. C, ed. (Elsevier Saunders), pp. 106-111.

Barbisin, M., Fang, R., O'Shea, C.E., Calandro, L.M., Furtado, M.R., and Shewale, J.G. (2009). Developmental Validation of the Quantifiler® Duo DNA Quantification *Kit* for Simultaneous Quantification of Total Human and Human Male DNA and Detection of PCR Inhibitors in Biological Samples*. *Journal of forensic sciences* 54, 305-319.

Bardale, R. (2011). *Principles of forensic medicine & toxicology* (JP Medical Ltd).

Bickley, J., Short, J.K., McDowell, D.G., and Parkes, H.C. (1996). Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. *Letters in Applied Microbiology* 22, 153-158.

Brevnov, M.G., Pawar, H.S., Mundt, J., Calandro, L.M., Furtado, M.R., and Shewale, J.G. (2009). Developmental Validation of the PrepFiler™ Forensic DNA Extraction *Kit* for Extraction of Genomic DNA from Biological Samples*. *Journal of forensic sciences* 54, 599-607.

Budowle, B., Baechtel, F.S., Comey, C.T., Giusti, A.M., and Klevan, L. (1995). Simple protocols for typing forensic biological evidence: Chemiluminescent detection for human DNA quantitation and restriction fragment length polymorphism (RELP) analyses and manual typing of polymerase chain reaction (PCR) amplified polymorphisms. *Electrophoresis* 16, 1559-1567.

Burg, A., Kahn, R., and Welch, K. (2011). DNA testing of sexual assault evidence: the laboratory perspective. *Journal of forensic nursing* 7, 145-152.

Butler, J.M. (2006). Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. *Journal of Forensic Sciences* 51, 253-265.

Butler, J.M. (2009). *Fundamentals of forensic DNA typing* (Academic Press).

Butler, J.M. (2011). Sample Collection, Storage, and Characterization. In *Advanced topics in forensic DNA typing: methodology* (Academic Press).

Costa, M., Cardoso, P., Barata, J., Moura, M., and Marques, C. (2014). Avaliação Médico-Leval em sexologia forense – Estudo de 5 anos no Gabinete Médico-Legal e Forense do Baixo Vouga. II Conferência do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (oral communication).

Dahlberg, L.L., and Krug, E.G. (2002). Violência - um problema global de saúde pública. In *Relatório mundial sobre violência e saúde* (Organização Mundial da Saúde Genebra), pp. 1 - 22.

Davidson, G., and Jalowiecki, T.B. (2012). Acid phosphatase screening - Wetting test paper or wetting fabric and test paper? *Sci Justice* 52, 106-111.

Diamandis, E., and Yu, H. (1995). Prostate-specific antigen and lack of specificity for prostate cells. *The Lancet* 345, 1186.

Donachie, G.E., Dawney, N., Ahmed, R., Naif, S., Duxbury, N.J., and Tribble, N.D. (2015). Assessing the impact of common forensic presumptive tests on the ability to obtain results using a novel rapid DNA platform. *Forensic science international Genetics* 17, 87-90.

Evers, H., Heidorn, F., Gruber, C., Lasczkowski, G., Risse, M., Dettmeyer, R., and Verhoff, M.A. (2009). Investigative strategy for the forensic detection of sperm traces. *Forensic Sci Med Pathol* 5, 182-188.

Funes-Huacca, M.E., Opel, K., Thompson, R., and McCord, B.R. (2011). A comparison of the effects of PCR inhibition in quantitative PCR and forensic STR analysis. *Electrophoresis* 32, 1084-1089.

García-Moreno, C., Jansen, H., Watts, C., and Heise, L. (2005). WHO Multi-country Study on Women's Health and Domestic violence against Women (World Health Organization).

Gefrides, L., and Welch, K. (2010). Serology and DNA. In *The forensic laboratory handbook procedures and practice* (Springer Science & Business Media), pp. 1-33.

Goodwin, W., Linacre, A., and Hadi, S. (2011). Biological material – collection, characterization and storage. In *An introduction to forensic genetics* (John Wiley & Sons), pp. 17-24.

Hall, D., and Fairley, M. (2004). A single approach to the recovery of DNA and firearm discharge residue evidence. *Sci Justice* 44, 15-19.

Hanson, E.K., and Ballantyne, J. (2014). A Y-short tandem repeat specific DNA enhancement strategy to aid the analysis of late reported (≥ 6 days) sexual assault cases. *Med Sci Law* 54, 209-218.

Herr, J., Summers, T., McGee, R., Sutherland, W., Sigman, M., and Evans, R. (1986). Characterization of a monoclonal antibody to a conserved epitope on human seminal vesicle-specific peptides: a novel probe/marker system for semen identification. *Biology of reproduction* 35, 773-784.

Hu, Q.Q., Liu, Y.X., Yi, S.H., and Huang, D.X. (2015). A comparison of four methods for PCR inhibitor removal. *Forensic Science International-Genetics* 16, 94-97.

Jewkes, R., Sen, P., and Garcia-Moreno, C. (2002). Violência sexual. In Relatório mundial sobre violência e saúde (Organização Mundial da Saúde Genebra), pp. 145 - 179.

Kellogg, N. (2011). Sexual Abuse of Children. In Child abuse and neglect Diagnosis, Treatment, and evidence, J. C, ed., pp. 63-152.

Laffan, Á., Sawyer, I., Quinones, I., and Daniel, B. (2011). Evaluation of semen presumptive tests for use at crime scenes. *Medicine, Science and the Law* 51, 11-17.

Larkin, A., and Harbison, S.A. (1999). An improved method for STR analysis of bloodstained denim. *Int J Legal Med* 112, 388-390.

Linacre, A., Pekarek, V., Swaran, Y.C., and Tobe, S.S. (2010). Generation of DNA profiles from fabrics without DNA extraction. *Forensic Science International-Genetics* 4, 137-141.

Lisboa, C., Braga, L.d.L., and Ebert, G. (2009). O fenômeno bullying ou vitimização entre pares na atualidade: definições, formas de manifestação e possibilidades de intervenção. *Contextos Clínicos* 2, 59-71.

Lounsbury, J.A., Nambiar, S.M., Karlsson, A., Cuniffe, H., Norris, J.V., Ferrance, J.P., and Landers, J.P. (2014). Enhanced recovery of spermatozoa and comprehensive lysis of epithelial cells from sexual assault samples having a low cell counts or aged up to one year. *Forensic Science International-Genetics* 8, 84-89.

Lunetta, P., and Sippel, H. (2009). Positive prostate-specific antigen (PSA) reaction in post-mortem rectal swabs: a cautionary note. *Journal of forensic and legal medicine* 16, 397-399.

Magalhães, T., Corte-Real, F., and Vieira, D.N. (2013). Gestão de vestígios forenses. In Agressões sexuais: Intervenção pericial integrada (SPECAN), pp. 75-102.

Magalhães, T., Dinis-Oliveira, R.J., Silva, B., Corte-Real, F., and Nuno Vieira, D. (2015). Biological evidence management for DNA analysis in cases of sexual assault. *The Scientific World Journal* 2015.

Magalhães, T., Taveira, F., Jardim, P., Santos, L., Matos, E., and Santos, A. (2009). Sexual abuse of children. A comparative study of intra and extra-familial cases. *Journal of forensic and legal medicine* 16, 455-459.

Magalhães, T., and Vieira, D.N. (2013). Introdução. In *Abuso & Negligência (SPECAN)*, pp. 9-18.

Moretti, T.R., Baumstark, A.L., Defenbaugh, D.A., Keys, K.M., Smerick, J.B., and Budowle, B. (2001). Validation of short tandem repeats (STRs) for forensic usage: Performance testing of fluorescent multiplex STR systems and analysis of authentic and simulated forensic samples. *Journal of Forensic Sciences* 46, 647-660.

Morling, N. (2009). PCR in forensic genetics. *Biochem Soc Trans* 37, 438-440.

Purps, J., Siegert, S., Willuweit, S., Nagy, M., Alves, C., Salazar, R., Angustia, S.M., Santos, L.H., Anslinger, K., and Bayer, B. (2014). A global analysis of Y-chromosomal haplotype diversity for 23 STR loci. *Forensic Science International: Genetics* 12, 12-23.

Saferstein, R. (2006). *Criminalistics: An Introduction to Forensic Science* (Prentice-Hall).

Santos, J.C., Neves, A., Rodrigues, M., and Ferrão, P. (2006). Victims of sexual offences: medicolegal examinations in emergency settings. *Journal of clinical Forensic medicine* 13, 300-303.

Schmedes, S., Marshall, P., King, J.L., and Budowle, B. (2013). Effective removal of co-purified inhibitors from extracted DNA samples using synchronous coefficient of drag alteration (SCODA) technology. *Int J Legal Med* 127, 749-755.

Scholz, M., Giddings, I., and Pusch, C.M. (1998). A polymerase chain reaction inhibitor of ancient hard and soft tissue DNA extracts is determined as human collagen type I. *Analytical Biochemistry* 259, 283-286.

Sensabaugh, G. (1978). Isolation and characterization of a semen-specific protein from human seminal plasma: a potential new marker for semen identification. *Journal of Forensic Science* 23, 106-115.

Uğur, Ş.S., and Sarişik, A.M. (2014). Deposition of nanoparticle multilayers to improve mechanical properties of denim fabrics. *The Journal of The Textile Institute* 106, 718-724.

Vallone, P.M., Hill, C.R., and Butler, J.M. (2008). Demonstration of rapid multiplex PCR amplification involving 16 genetic loci. *Forensic Science International-Genetics* 3, 42-45.

Van Oorschot, R., Phelan, D., Furlong, S., Scarfo, G., Holding, N., and Cummins, M. (2003). Are you collecting all the available DNA from touched objects? In *International Congress Series* (Elsevier), pp. 803-807.

Walsh, P.S., Fildes, N.J., and Reynolds, R. (1996). Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acids Research* 24, 2807-2812.

Wilson, I.G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 3741-3751.

Wilson, I.G. (2001). Problems with the Polymerase Chain Reaction. In *Food Microbiology Protocols* (Springer Science & Business Media), pp. 427-480.

World Health Organization (2003). Guidelines for medico-legal care of victims of sexual violence.

Yoshii, T., Akiyama, K., Tamura, K., and Ishiyama, I. (1994). PCR inhibitor: water-soluble melanin, which inhibits DNA polymerases and DNases. In *Advances in Forensic Haemogenetics* (Springer Berlin Heidelberg), pp. 393-396.

Young, C.C., Burghoff, R.L., Keim, L.G., Minak-Bernero, V., Lute, J.R., and Hinton, S.M. (1993). Polyvinylpyrrolidone-agarose gel electrophoresis purification of

polymerase chain reaction-amplifiable DNA from soils. *Applied and environmental microbiology* 59, 1972-1974.

Yu, H., and Diamandis, E.P. (1995). Prostate-specific antigen in milk of lactating women. *Clinical chemistry* 41, 54-58.

Zahra, N., Hadi, S., Smith, J.A., Iyengar, A., and Goodwin, W. (2011). Development of internal amplification controls for DNA profiling with the AmpF ℓ STR[®] SGM Plus[®] *kit*. *Electrophoresis* 32, 1371-1378.

8. Anexos

Anexo 1

Quantidades de amostra utilizada (µL)

(Kit AmpF ℓ STR® MiniFiler™)

128 amostras

	AD	AZ	LD	LZ	PD	PZ	GD	GZ
C1	2	2	5	10	2	10	10	10
C2	5	10	10	10	9	10	10	10
C3	1	1	1	1	1	10	10	10
C4	10	10	5	10	3	10	10	10
C5	2	3	1	3	3	10	5	10
C6	1,5	1	1	1	1	5	1	8
C7	3	1	3	3	1	10	9	10
C8	10	8	10	9	3	10	10	10
C9	8	2	5	4	1	10	10	10
C10	5	10	10	10	5	10	10	10
C11	8	8	1	10	1	8	10	10
C12	10	10	10	10	9	10	10	10
H1	10	10	7	10	10	10	10	10
H2	2	1	10	3	10	10	3	10
H3	4	1	1	3	1	10	1	10
H4	5	10	2	10	3	10	10	10

Anexo 2

Quantidades de amostra utilizada (µL)

(Kit Yfiler® Plus PCR)

41 amostras

	AD	AZ	LD	LZ	PD	PZ	GD	GZ
C1						5	5	5
C2			5		5	5	5	5
C3							5	
C4						5	5	5
C5					2		4	5
C6								5
C7							5	5
C8					5	5	5	5
C9							5	5
C10			5		5	5	5	5
C11								
C12						5		5
H1							5	5
H2			5		5	5		5
H3						5		
H4					5	5		5

Anexo 3

Quantidades de amostra utilizada (µL)

(Kit Investigator Argus X-12 QS)

5 amostras

IIIH4PD	2
IIIC5PD	2
IIIC5GD	3,75
IIIC7GD	2
IIIH1GZ	7,5

Anexo 4

INFORMAÇÃO AO PARTICIPANTE

Título do estudo: DNA testing and sexual assault – contribution to the improvement of the management and analysis of forensic biological traces (Análise de DNA e agressão sexual – contribuição para o aperfeiçoamento da gestão e análise de vestígios biológicos forenses)

Este documento contém informação sobre o estudo realizado no âmbito da Tese de Doutoramento de Benedita Abreu Ferreira da Silva, estudante da Universidade do Porto, intitulado “DNA testing and sexual assault – contribution to the improvement of the management and analysis of forensic biological traces”. Para a sua realização necessito da colaboração de alguns casais.

Se ao ler esta folha de ‘Informação ao Participante’ houver algo que não entenda, ou se quiser mais esclarecimentos sobre o estudo, esteja à vontade para colocar as suas questões.

Qual o objetivo do estudo?

A violência sexual afeta milhões de pessoas em todo o mundo, sendo as vítimas, normalmente, do sexo feminino. Esta prática pode provocar lesões graves e permanentes para a saúde física e mental das vítimas, sendo, portanto, o seu estudo de suma importância. Por vezes, por vergonha ou desconhecimento da vítima, pelo tipo de práticas sexuais realizadas ou, até mesmo, pelos cuidados tidos em conta pelo agressor, os vestígios biológicos encontrados, após análise, não permitem obter resultados conclusivos. Este facto leva a que o agressor não seja identificado.

É, portanto, o objetivo desta investigação estudar os novos materiais, metodologias e técnicas, de forma a tentar perceber quais são as que permitem a obtenção de bons resultados, mesmo quando os vestígios não se encontram nas quantidades e condições ideais.

O que irei fazer se aceitar participar?

Será pedido aos participantes do sexo masculino amostras de sémen e saliva que serão recolhidas pelo próprio num recipiente esterilizado e próprio para o efeito. Aos elementos do sexo feminino serão depositadas nos seus antebraços, por várias vezes, diversas quantidades de material biológico do seu respetivo companheiro, para posteriormente se proceder à recolha deste, usando zaragatoas.

A recolha das amostras poderá exigir que os participantes se tenham de deslocar ao INMLCF, I.P. pelo menos duas vezes, por forma a conseguirmos obter a quantidade de sémen e saliva necessária para as diferentes etapas deste projeto.

Aquando da recolha do material biológico serão explicadas as diferentes fases de processamento das amostras.

Sou obrigado(a) a participar?

A sua participação neste estudo é voluntária. Pode levar o tempo que necessitar para decidir se quer ou não participar e para conferenciar com o seu companheiro. Se decidir participar, pode desistir em qualquer altura sem ter que dar qualquer justificação. A sua participação no estudo não será remunerada.

Os meus dados serão confidenciais?

Os dados recolhidos destinam-se a ser usados exclusivamente nesta investigação e serão tratados de forma anónima. Não terá qualquer identificação pessoal, mantendo, desta forma, a máxima confidencialidade dos seus dados pessoais. Também a informação obtida não será utilizada para quaisquer outros fins.

O material biológico colhido será destruído após o estudo e nunca será usado para qualquer outra finalidade.

Este estudo irá ser publicado em Revistas Científicas ou divulgado em Congressos, mas sempre sem revelar o nome dos participantes.

A participação no estudos poderá trazer riscos ou benefícios?

A sua participação no estudo não lhe trará nem riscos, nem benefícios diretos; todavia, a análise das amostras recolhidas, poderá ajudar a compreender melhor as novas técnicas e metodologias, contribuindo para aperfeiçoar a gestão e análise de vestígios biológicos forenses. Este conhecimento poderá, posteriormente, ser implementado para permitir obter diagnósticos corretos e fundamentados, assentes na evidência científica. Devemos estes esforços a todas as vítimas, por forma a garantir-lhes a confiança e segurança que necessitam.

Se decidir participar, ser-lhe-á entregue esta folha de 'Informação ao Participante' para guardar e ser-lhe-á pedido que assine a declaração de Consentimento Informado.

Para mais informações ou esclarecimentos não hesite em contactar através do seguinte email: beneditaferreiradasilva@gmail.com

Muito obrigada pela atenção.

Data: ____/____/____

A Investigadora: _____

Anexo 5

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

*Considerando a “Declaração de Helsínquia” da Associação Médica Mundial
(Helsínquia 1964; Tóquio 1975; Veneza 1983; Hong Kong 1989; Somerset West 1996 e Edimburgo 2000)*

Análise de DNA e agressão sexual – contribuição para o aperfeiçoamento da gestão e análise de vestígios biológicos forenses

Eu, abaixo-assinado, _____,
tomei conhecimento do estudo em que serei incluído(a) e compreendi a explicação que me foi
fornecida acerca da investigação que se tenciona realizar. Foi-me ainda dada oportunidade de fazer
as perguntas que julguei necessárias e de todas obtive resposta satisfatória.

Foi-me dado a conhecer que, de acordo com as recomendações da Declaração de Helsínquia, a
informação ou explicação que me foi prestada versou os objetivos, os métodos, os benefícios
previstos, os riscos potenciais e o eventual desconforto da investigação em curso.

Foi-me ainda explicado que os registos dos resultados poderão ser consultados pelos responsáveis
científicos e ser objeto de publicação, mas que os elementos da identidade pessoal serão sempre
tratados de modo estritamente confidencial, uma vez que apenas o investigador principal terá acesso
ao documento onde se encontram as concordâncias entre o código dado à amostra e os dados dos
participantes.

Também me foi esclarecido que o material biológico colhido será destruído após o estudo e nunca
será usado para qualquer outra finalidade. Por fim, foi-me afirmado que tenho o direito de recusar
a todo o tempo a minha participação no estudo, sem que isso possa ter como efeito qualquer
prejuízo.

Aceito participar de livre vontade no estudo acima mencionado.

Concordo que seja efetuada a colheita de amostras biológicas para realizar as análises e os estudos
genéticos que fazem parte desta investigação.

Também consinto a divulgação dos resultados obtidos no meio científico, desde que seja garantido
o seu anonimato.

Data: ____ / ____ / 201__

Assinatura do voluntário: _____

O Investigador responsável: _____

Anexo 6

Procedimento (Casais)

Neste estudo vão ser analisados quatro tipos diferentes de tecidos, a ganga, o poliéster/elastano, o acrílico e a lã. Os voluntários podem escolher um dos seguintes métodos de recolha, consoante o que considerem mais cómodo:

1º Método de recolha: pede-se às voluntárias do estudo que espalhem o sémen do seu companheiro numa região do corpo com que se sintam confortáveis, preferencialmente nos antebraços e numa camada não muito fina. O sémen a aplicar poderá ser recolhido usando um preservativo, ou um pequeno recipiente, e de seguida espalhado com uma zaragatoa. De seguida passar por cima com um dos tecidos, de forma a limpar a totalidade do sémen. Repetir este passo para todos os tecidos. É importante que a quantidade espalhada seja semelhante nos 4 tecidos e que, depois da recolha, deixe o tecido a secar um pouco antes de colocar novamente dentro do respetivo envelope (cerca de 15/20 minutos). Pode ser utilizado o mesmo ejaculado para a recolha de todos os tecidos.



Figura 1. Esquema do antebraço da mulher

2º Método de recolha: pede-se aos voluntários que ejaculem para uma zona do corpo da sua companheira que ambos se sintam confortáveis (braço, perna, barriga, etc.). Não devem limpar com os tecidos uma zona de ejaculação direta, mas sim uma zona com menor quantidade de sémen, de forma a não ficar muito evidente uma macha no tecido. Podem ser utilizados os 4 tecidos com o mesmo ejaculado, mas tendo sempre em atenção a quantidade de sémen. Deixar o tecido a secar um pouco antes de colocar novamente dentro do respetivo envelope (cerca de 15/20 minutos).

- **Recolhas das amostras de referência:** é necessário a recolha de uma amostra referência de cada um dos participantes e assinalar a quem se refere, em cada embalagem. A recolha é feita com uma zaragatoa de algodão (tem a indicação qual é a de referência) na cavidade bucal, na parte interna na bochecha, e são necessários 5 movimentos, 3 para cima e 2 para baixo, por exemplo. Deve-se abrir a embalagem desta zaragatoa até meio, e esta, após utilizada, pode ser imediatamente armazenada na embalagem, no entanto, deve-se deixar a embalagem com a aba de plástico transparente aberta até meio durante uma hora e só depois fechar e guardar. Antes de avançar com esta recolha devem engolir toda a saliva que têm na boca e enxaguar a boca caso tenham bebido café ou mastigado pastilhas elásticas.

Anexo 7

Procedimento (Homens)

Neste estudo vão ser analisados quatro tipos diferentes de tecidos, a ganga, o poliéster/elastano, o acrílico e a lã. Os voluntários podem escolher um dos seguintes métodos de recolha, consoante o que considerem mais cómodo:

1º Método de recolha: pede-se aos voluntários do estudo que espalhem o sémen numa região do corpo com que se sintam confortáveis, preferencialmente nos antebraços, numa camada não muito fina. O sémen a aplicar poderá ser recolhido usando um preservativo, ou um pequeno recipiente, e espalhado com uma zaragatoa. De seguida passar por cima com um dos tecidos, de forma a limpar a totalidade do sémen. Repetir este passo para todos os tecidos. É importante que a quantidade espalhada seja semelhante nos 4 tecidos e que, depois da recolha, deixe o tecido a secar um pouco antes de colocar novamente dentro do respetivo envelope (cerca de 15/20 minutos). Pode ser utilizado o mesmo ejaculado para a recolha de todos os tecidos.



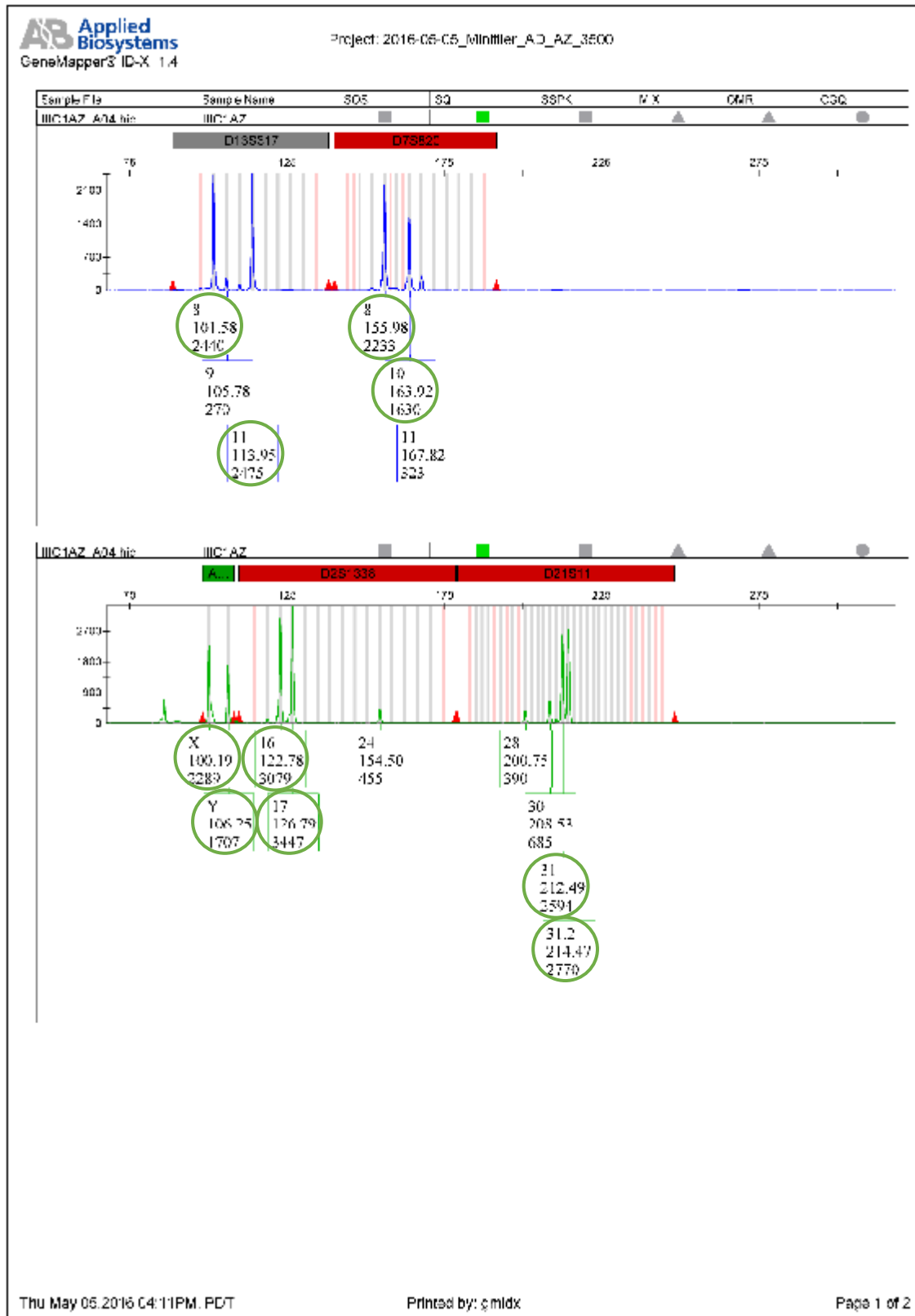
Figura 2. Esquema do antebraço do homem

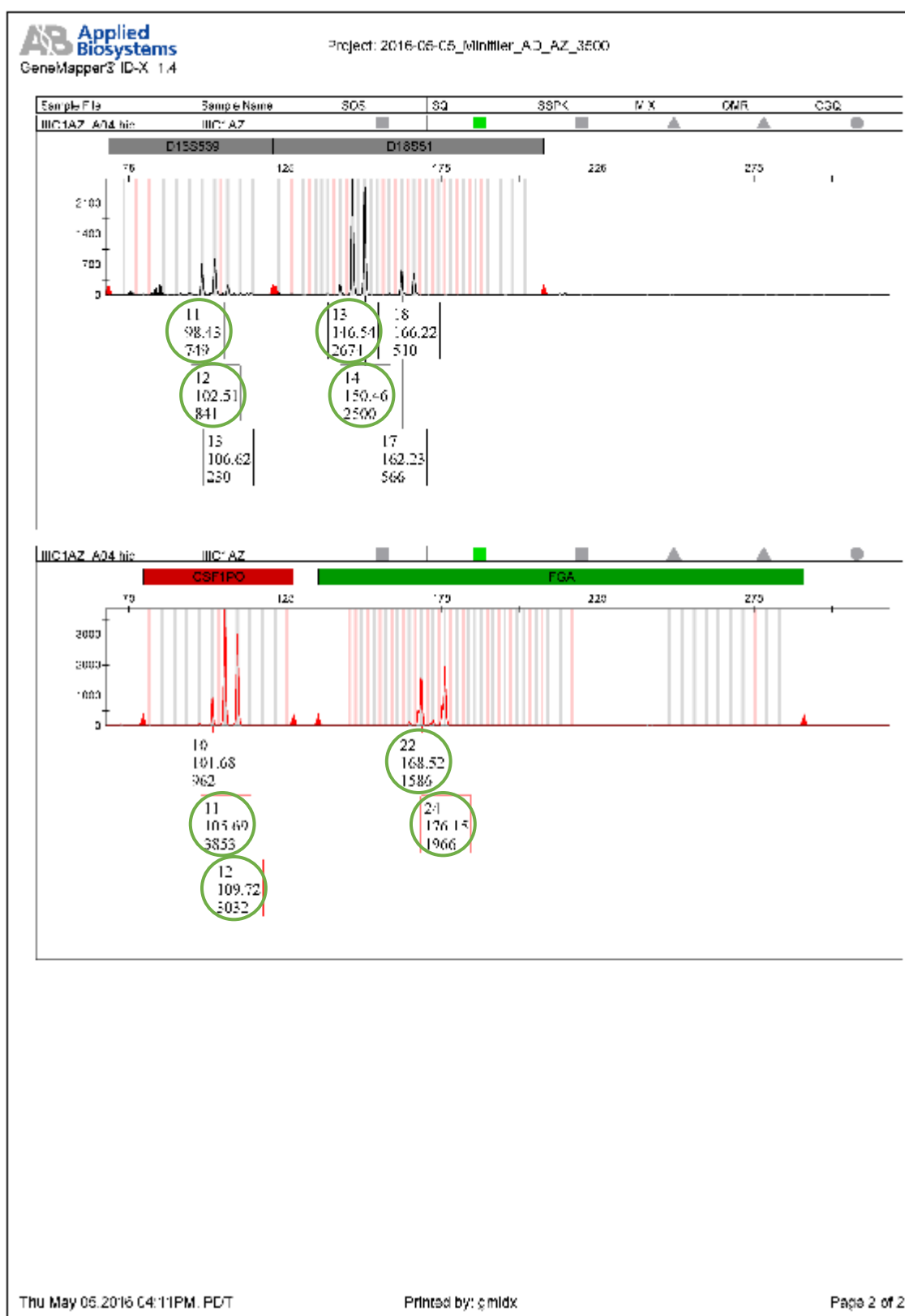
2º Método de recolha: pede-se aos voluntários que ejaculem para uma zona do seu corpo que se ficam confortáveis (perna, braço, barriga, etc.). Não devem limpar com os tecidos uma zona de ejaculação direta, mas sim uma zona com menor quantidade de sémen, de forma a não ficar muito evidente uma macha. Podem ser utilizados os 4 tecidos para o mesmo ejaculado, mas tendo sempre em atenção a quantidade de sémen. Deixar o tecido a secar um pouco antes de colocar novamente dentro do respetivo envelope (cerca de 15/20 minutos).

- **Recolha da amostra de referência:** é necessário a recolha de uma amostra referência do participante e assinalar na embalagem. A recolha é feita com uma zaragatoa de algodão (tem a indicação qual é a de referência) na cavidade bucal, na parte interna na bochecha, e são necessários 5 movimentos, 3 para cima e 2 para baixo, por exemplo. Deve-se abrir a embalagem desta zaragatoa até meio, e esta, após utilizada, pode ser imediatamente armazenada na embalagem, no entanto, deve-se deixar a embalagem com a aba de plástico transparente aberta até meio durante uma hora e só depois fechar e guardar. Antes de avançar com esta recolha devem engolir toda a saliva que têm na boca e enxaguar a boca caso tenham bebido café ou mastigado pastilhas elásticas.

Anexo 8

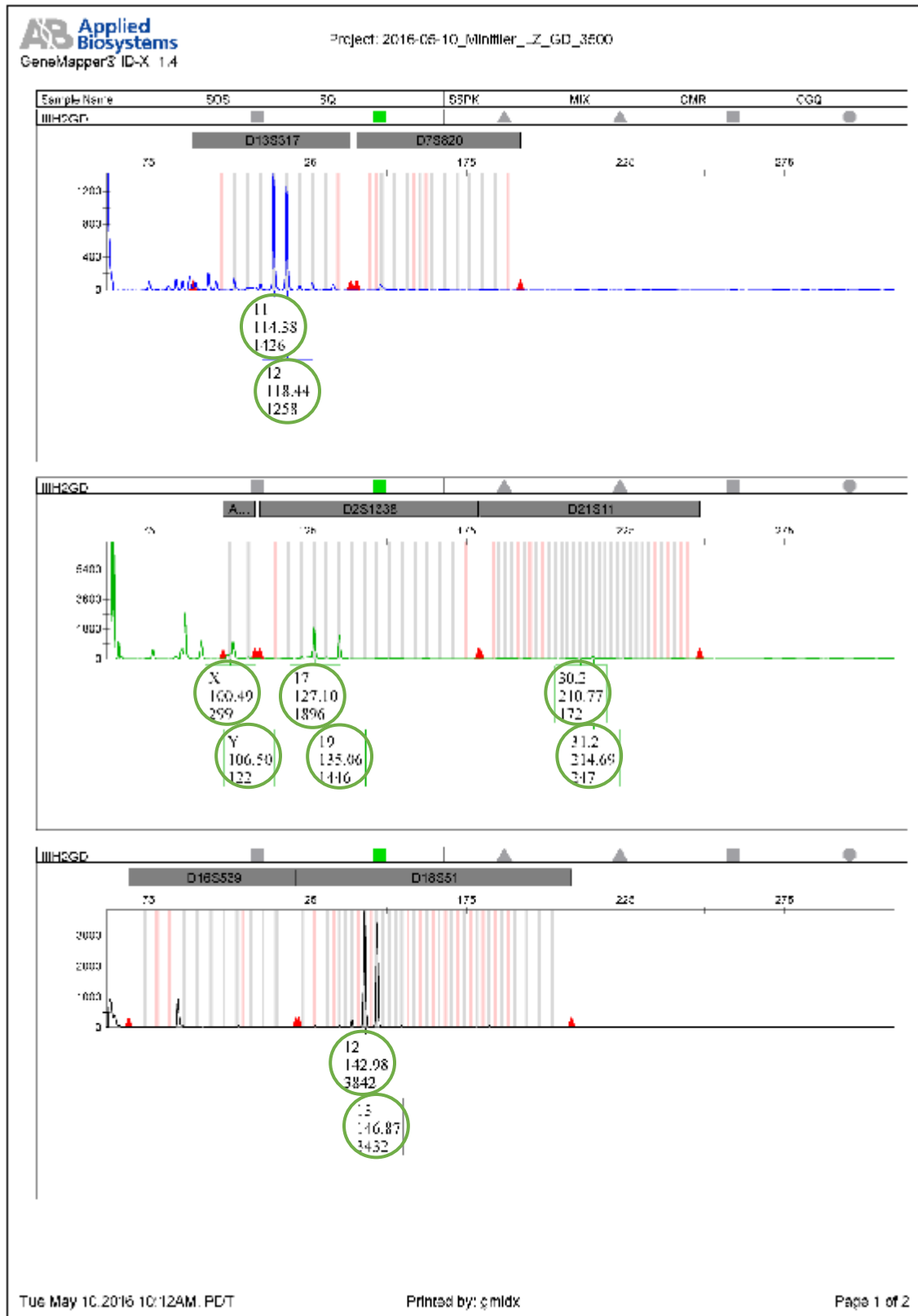
Exemplo de “perfil completo” masculino (*Kit AmpF ℓ STR® MiniFiler™*)



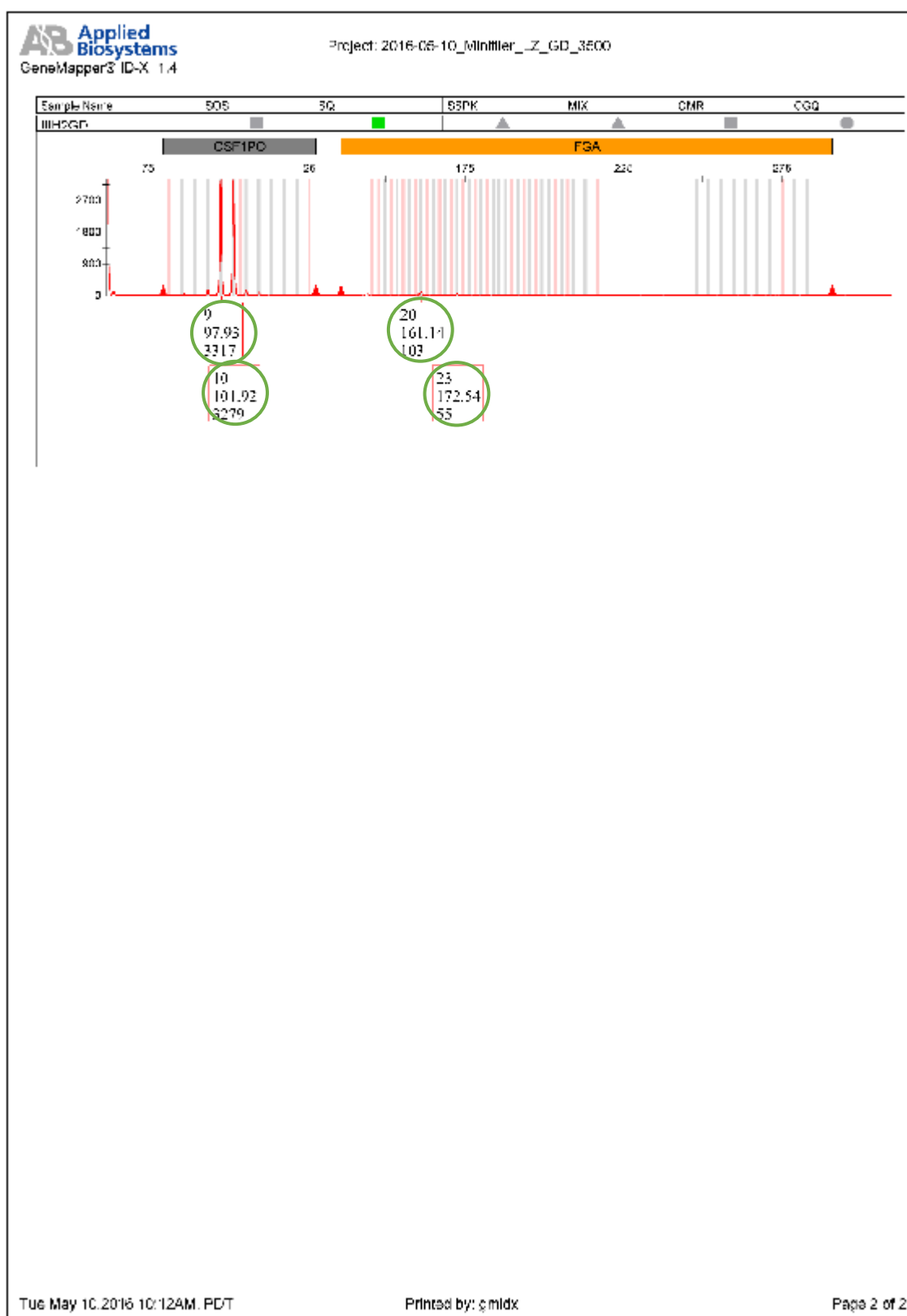


Anexo 9

Exemplo de “perfil incompleto” masculino (*Kit AmpF ℓ STR® MiniFiler™*)

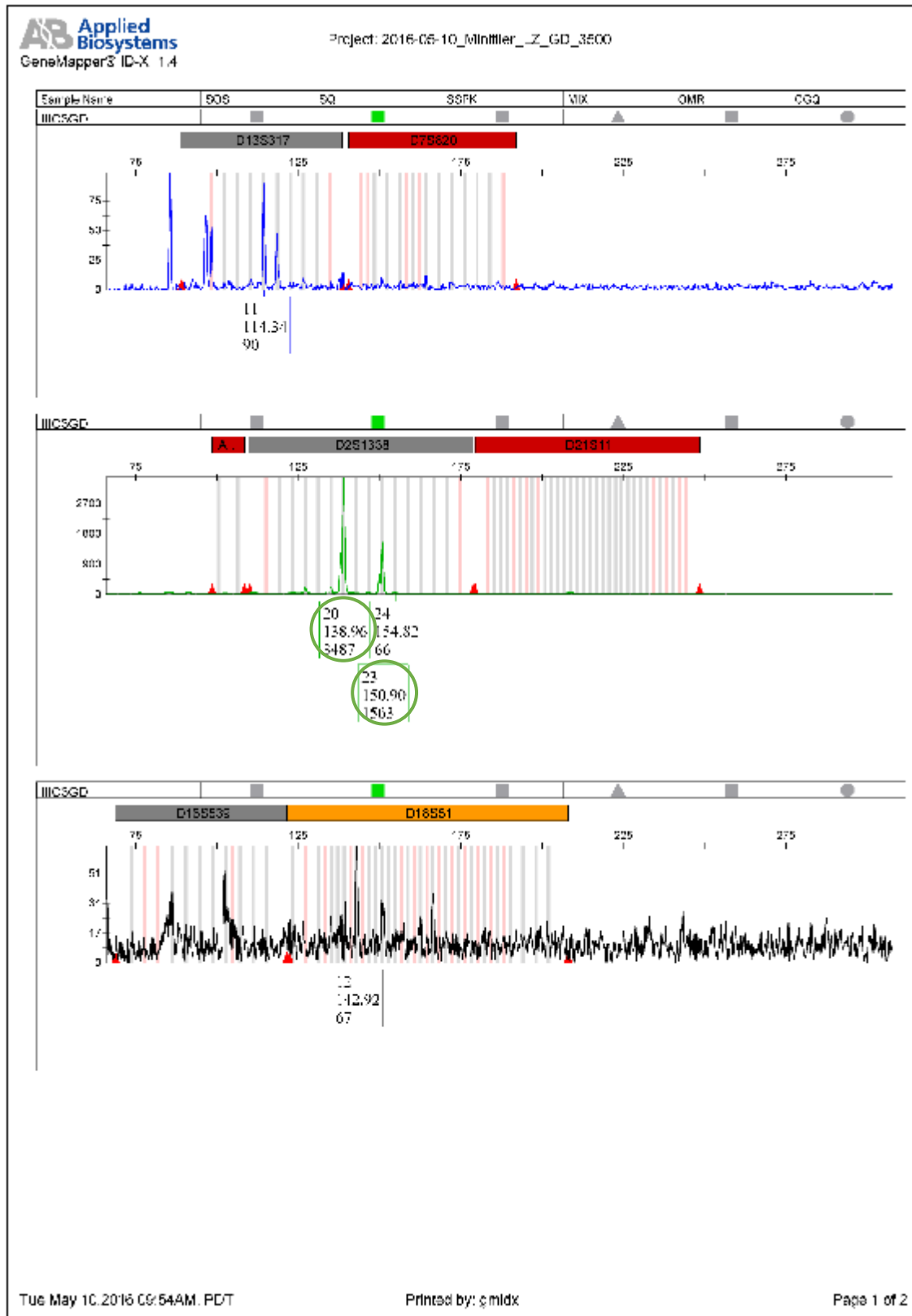


- 64 | FCUP
 Comparação de diferentes métodos de análise de manchas de sêmen,
 em tecidos analisados na rotina forense.

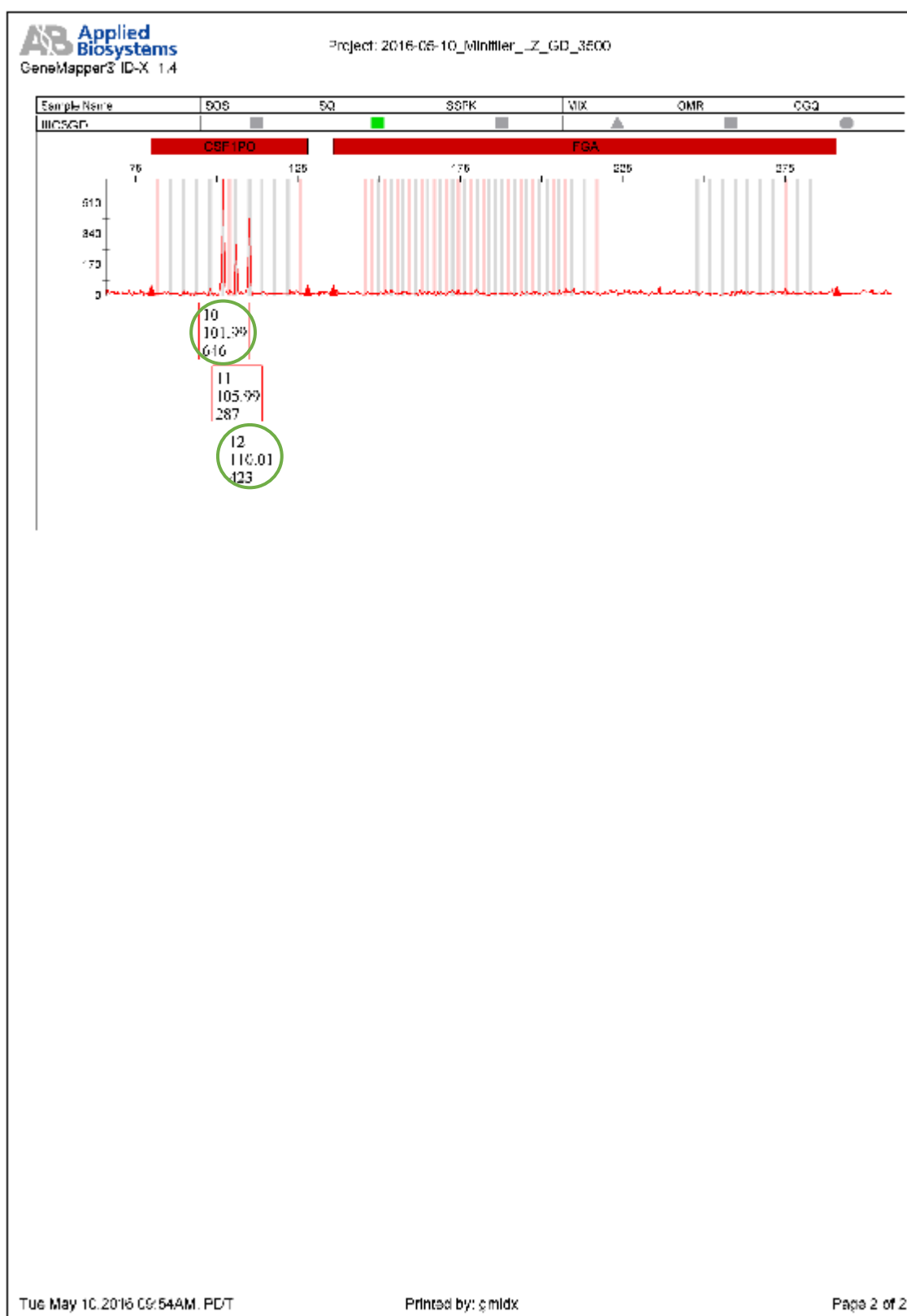


Anexo 10

Exemplo de um “sem perfil” (*Kit AmpF ℓ STR® MiniFiler™*)

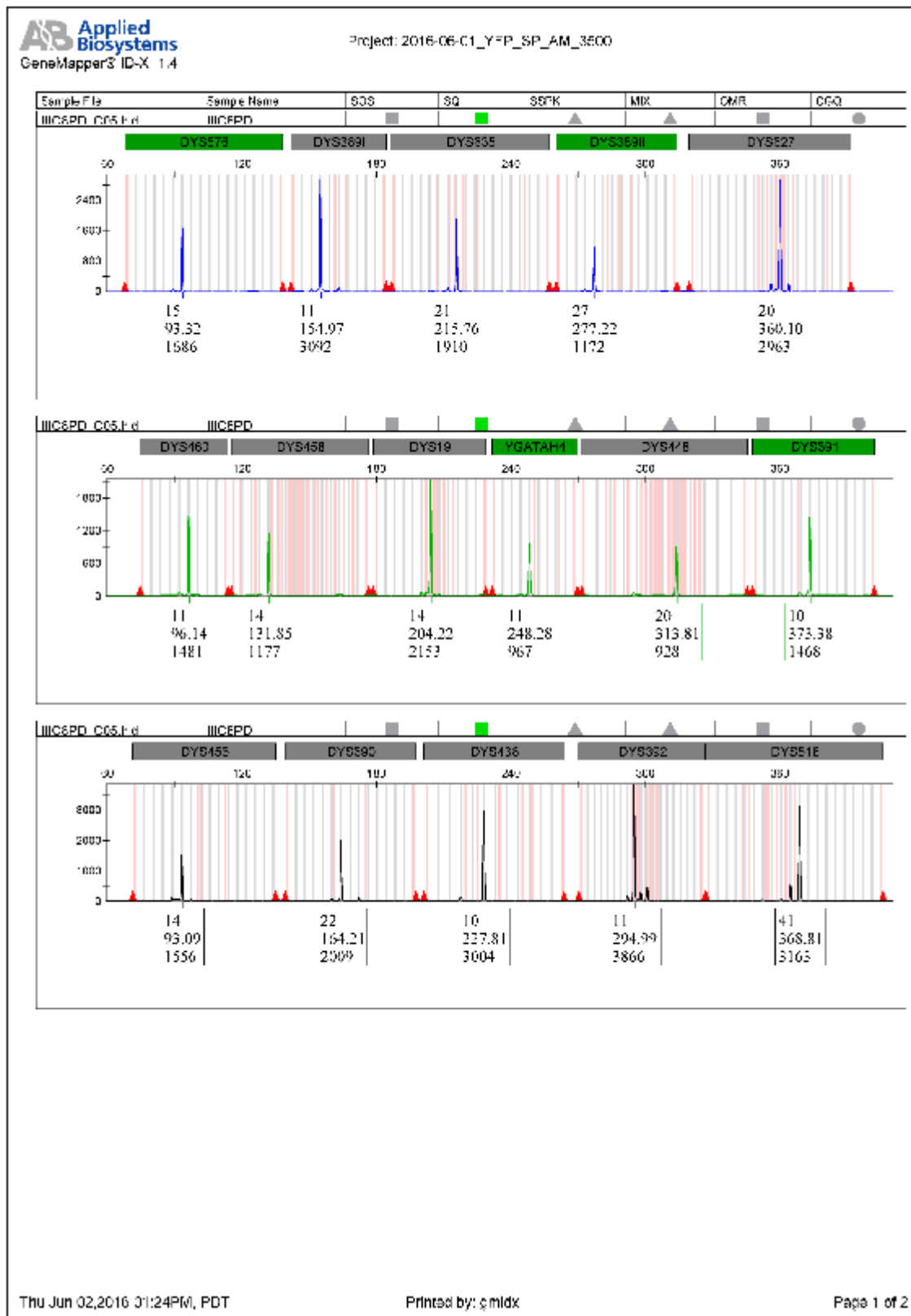


- 66 | FCUP
 Comparação de diferentes métodos de análise de manchas de sêmen,
 em tecidos analisados na rotina forense.



Anexo 11

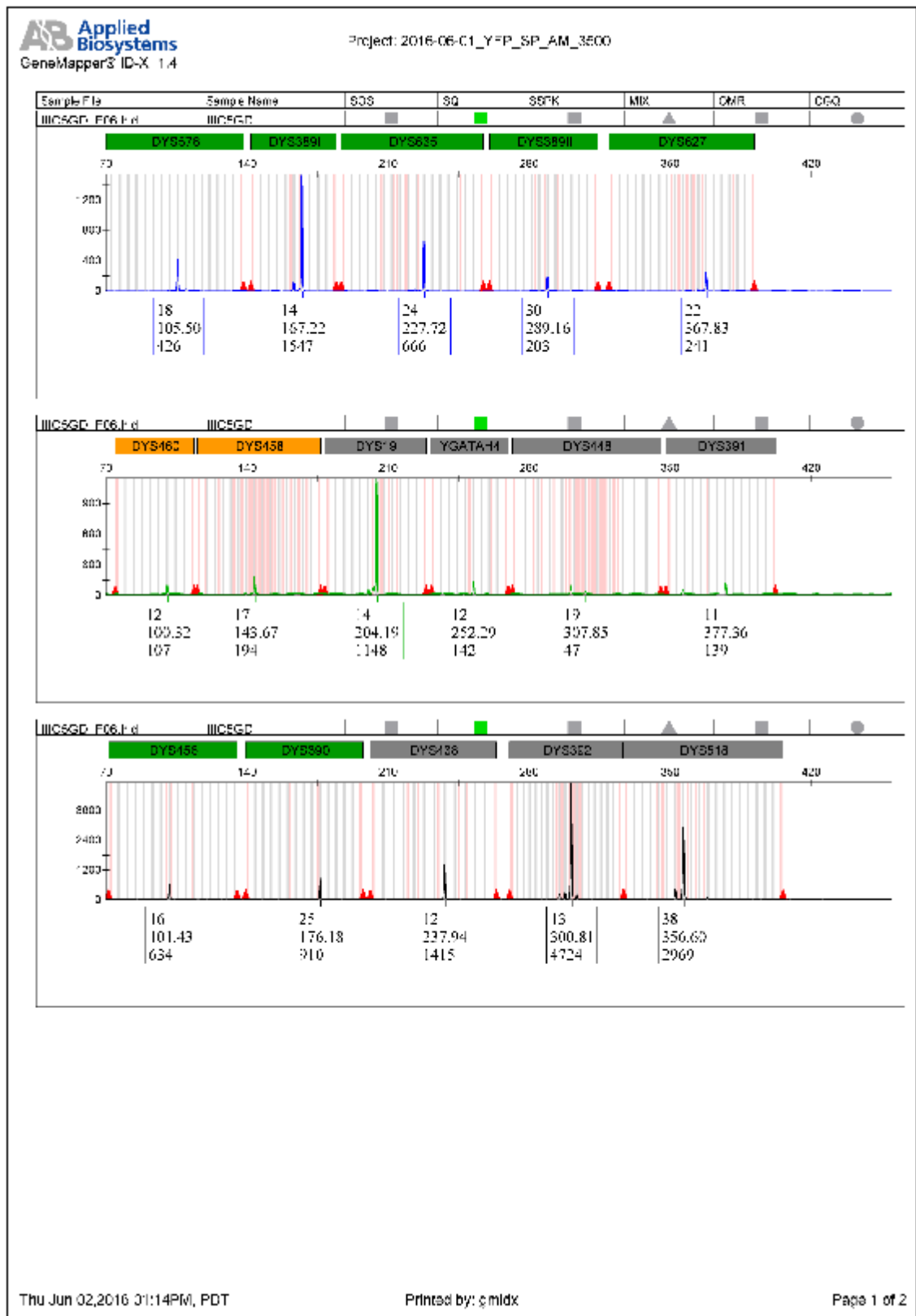
Exemplo de um “haplótipo completo” do cromossoma Y (*Kit Yfiler® Plus PCR*)



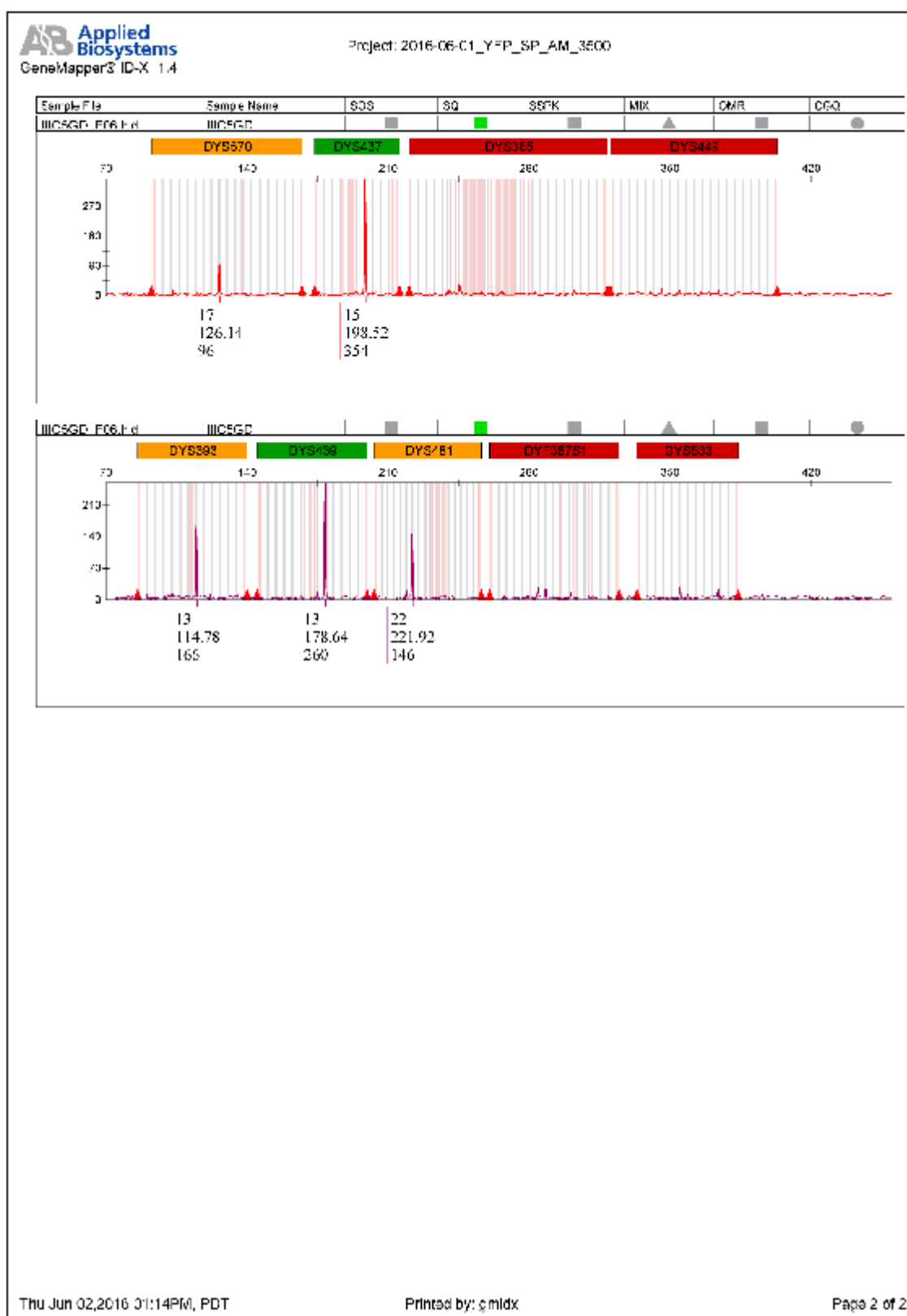


Anexo 12

Exemplo de um “sem haplótipo” do cromossoma Y (*Kit Yfiler® Plus PCR*)

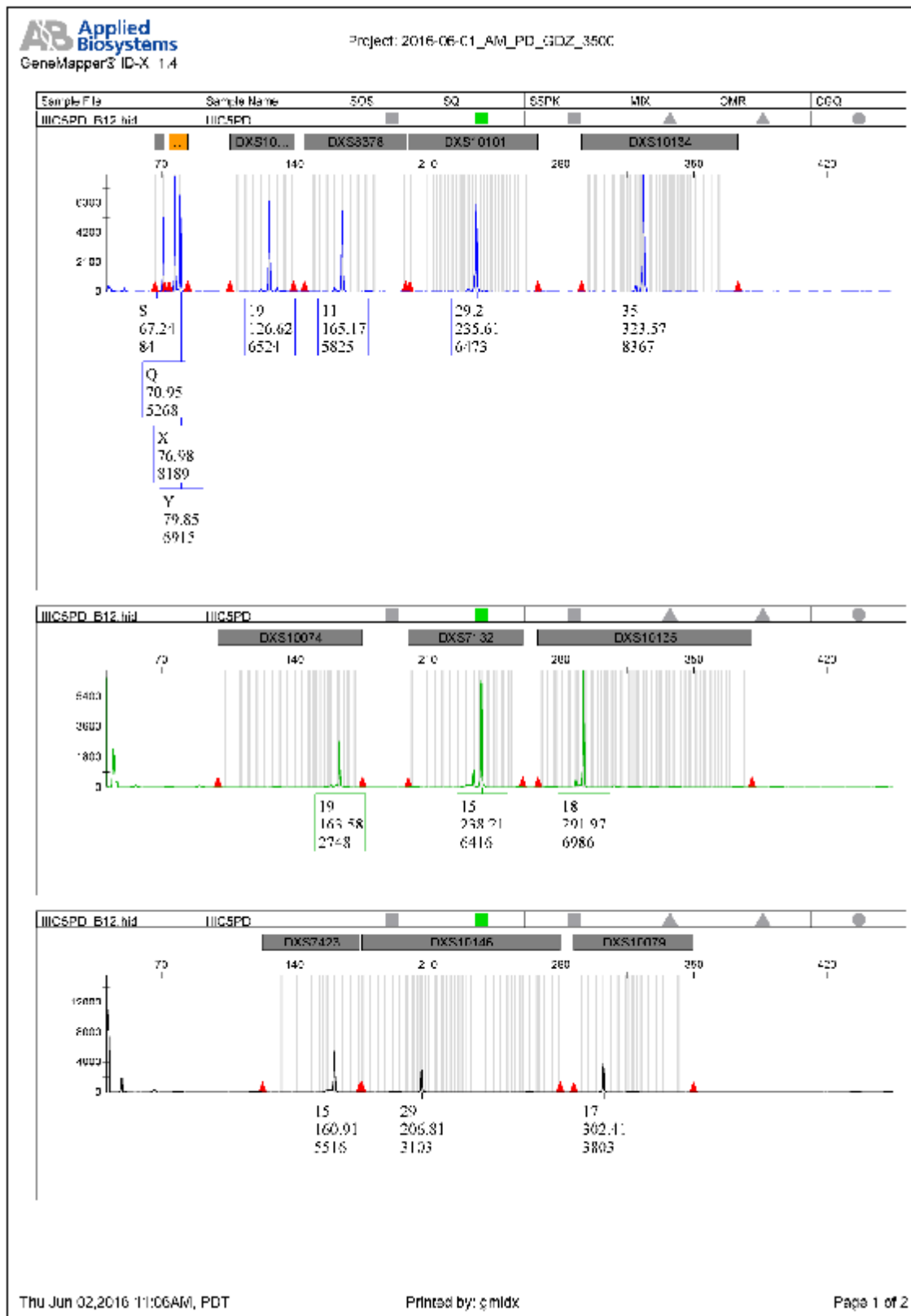


- 70 | FCUP
 Comparação de diferentes métodos de análise de manchas de sêmen,
 em tecidos analisados na rotina forense.

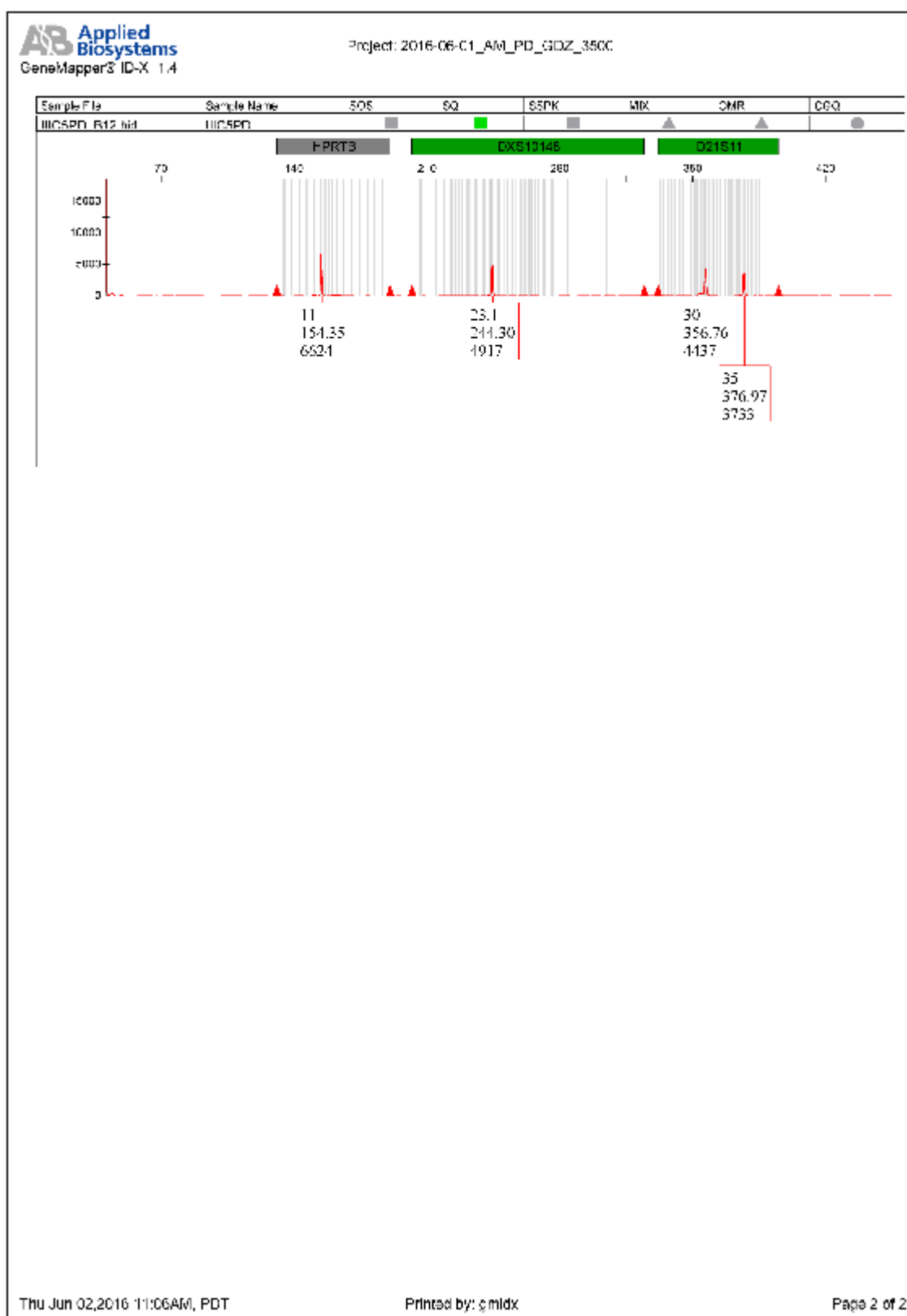


Anexo 13

Exemplo de um perfil completo (*Kit Investigator Argus X-12 QS*)



- 72 | FCUP
 Comparação de diferentes métodos de análise de manchas de sêmen,
 em tecidos analisados na rotina forense.



No âmbito deste trabalho, foram apresentadas as seguintes comunicações em formato poster:



REVIEW: MÉTODOS DE RECOLHA DE VESTÍGIOS BIOLÓGICOS EM CASOS DE AGRESSÃO SEXUAL

A. Capitão ^{1*}, M. Gouveia^{1*}, B. Silva² e L. Cainé^{2,3}

* Igual contribuição de autores

¹ Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Portugal

² Departamento de Medicina Legal e Ciências Forense, Faculdade de Medicina, Universidade do Porto, Portugal

³ Serviço de Genética e Biologia Forenses, Delegação do Norte, Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.

Introdução

A análise de ADN é muito importante na resolução de agressões sexuais (AS) pela facilidade com que o agressor pode deixar vestígios biológicos. Esta permite eliminar potenciais suspeitos, ou colocá-los no local do crime.

A análise de zaragatoas vaginais e anais, bem como das cuecas da vítima são amostras comuns em AS, uma vez que as vítimas são maioritariamente indivíduos do sexo feminino e o sêmen apresenta-se como vestígio biológico de eleição a analisar.

Nestes crimes as amostras normalmente possuem pouca quantidade de ADN masculino e a recolha raramente é feita logo após o ato. De referir que os têxteis analisados se podem apresentar problemáticos para análise, por possuírem inibidores de PCR ou um elevado espaçamento entre as fibras, impedindo a retenção da amostra.

Aumentar o nº ciclos na PCR ou utilizar mini-STRs são algumas sugestões para ultrapassar estes problemas, no entanto estes podem resultar em *Allele drop-in* ou aumento de *stutters*.

Assim, melhorar as técnicas de recolha consiste no próximo passo para tentar melhorar a obtenção de resultados genéticos.

MÉTODOS DE RECOLHA

Análise de Tecidos

No caso dos vestígios estarem contidos em têxteis, é necessário ter em conta os corantes utilizados no fabrico dos mesmos (e.g indigo dye, presente na ganga, é um conhecido inibidor da PCR).

Os métodos utilizados para recolha de material biológico em tecidos incluem:

- 1) Cortar parte do tecido na zona de interesse e armazenar num tubo estéril;
- 2) Utilizar uma zaragatoa de algodão estéril friccionando a ponta sobre a superfície do tecido; considera-se ser este o método mais adequado;
- 3) Pressionar uma fita adesiva sobre o tecido e, de seguida, cortar a fita para dentro de um tubo estéril.

Análise de Zaragatoas

Existem várias técnicas associadas ao uso da zaragatoa na recolha de material biológico ficando, geralmente, ao critério do perito que executa a perícia qual utilizar:

- 1) Uma zaragatoa - passagem da zaragatoa no vestígio, rodando-a, assegurando que toda a ponta entra em contacto com o vestígio;
- 2) Duas zaragatoas simultaneamente - método similar ao primeiro, mas que acrescenta o uso de duas zaragatoas, ao mesmo tempo; apresenta a desvantagem de dispersar os vestígios pelas duas zaragatoas, o que afeta a análise
- 3) "Double swabbing technique" - utilização de duas zaragatoas: a primeira humedecida, e logo de seguida é passado no mesmo local uma segunda zaragatoa seca. A eficiência deste método relativamente aos outros começa a ser testada, no entanto, a maioria dos peritos privilegiam ainda o uso do primeiro método.

Conclusões

Quando a qualidade e quantidade de ADN nas amostras forenses é diminuta, é essencial que o método de recolha seja o mais eficiente possível.

Esta revisão pretende salientar a importância da criação de um protocolo padronizado, que vise a obtenção de boas amostras em casos de AS, no sentido de:

- maximizando a eficiência das análises efetuadas;
- evitar casos de vitimização secundária;
- evitar perda de amostras essenciais;
- garantir uma transferência mínima de inibidores e simultaneamente um máximo possível de amostra.

Referências Bibliográficas

1. Magalhães, T., Dinis-Oliveira, R.J., Silva, B., Corte-Real, F., and Nuno Vieira, D. (2015). Biological evidence management for DNA analysis in cases of sexual assault. The Scientific World Journal 2015;
2. Adamowicz, M.S., Stasulli, D.M., Sobestanovich, E.M., and Bille, T.W. (2014). Evaluation of methods to improve the extraction and recovery of DNA from cotton swabs for forensic analysis. PloS one 9, e116351;
3. Linacre, A., Pekarek, V., Swaran, Y.C., and Tobe, S.S. (2010). Generation of DNA profiles from fabrics without DNA extraction. Forensic Sci Int-Genet 4, 137-141;
4. Sweet, D., Lorente, M., Lorente, J.A., Valenzuela, A., and Villanueva, E. (1997). An improved method to recover saliva from human skin: the double swab technique. Journal of Forensic Sciences 42, 320-322.

1º Congresso Associação Portuguesa de Ciências Forenses

4º Congresso Sociedade Portuguesa para o Estudo da Criança Abusada e Negligenciada - 12 e 13 de Fevereiro

Nota: Trabalho realizado no âmbito do Programa Doutoral em Ciências Forenses e Mestrado em Genética Forense



Review: Methods of collection and analysis of DNA in semen stains on different textiles



M. Gouveia¹, A. Capitão¹, B. da Silva² e L. Cainé^{2,3}

¹ Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Porto, Portugal

² Department of Forensic Genetics and Biology, North Delegation, National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences, I.P., Portugal

³ Department of Legal Medicine and Forensic Sciences, Faculty of Medicine, University of Porto, 4200-450 Porto, Portugal

Introduction

In today's society, one of the most prevalent crimes are the sexual assaults (SA). In this type of crime the most common victims are women, so the detection and analysis of semen in the investigations is of utmost importance, not only to prove sexual contact but also to help identify the perpetrator.

In SA investigations the clothes that the victim wore during the assault (e.g. underwear) and/or the bed sheets, if the assault took place in bed, are frequently analysed.

Genetic analysis of biological materials retained in textiles can be problematic due to the dyes used in their manufacture (e.g. indigo dye used in denim, a known inhibitor of PCR) and due to the large spacing of the fibers, which can complicate an efficient collection, resulting in samples with low-template DNA.

Increasing PCR cycles or using mini-STRs are some suggestions to overcome these problems, however this may result in allele drop-in or increase stutter. Therefore, the improvement of collection techniques in textiles is probably the next step to enhance the success of genotyping.

Methods of collection in textiles (advantages and disadvantages)

Cut the fabric in the zone of interest

- Collection of a larger amount of sample;
- Larger transfer of inhibitory compounds to the sample.

Use a wet cotton swab, rubbing the tip on the trace

- Hydration and consequent release of cells from the tissue making the collection easier;
- Concentration of the material in one smaller and analysable sample;
- Less transfer of inhibitory compounds to the sample.

Repeatedly pressing an adhesive on the fabric

- Concentration of the material in one smaller and analysable sample;
- Less transfer of inhibitory compounds to the sample.

Conclusion

In forensic cases in which the quality and/or quantity of DNA available for analysis is very small, it is essential that the method of collection is as efficient as possible. This review aims to highlight the importance of creating a standardized protocol for methods of collection in textiles in order to:

Ensure minimum inhibitor transference while simultaneously a maximum possible quantity of sample

- Ensuring improvement of the analysis efficiency;
- Avoiding loss of crucial samples.

References

1. Magalhães, T., Dinis-Oliveira, R.J., Silva, B., Corte-Real, F., and Nuno Vieira, D. (2015). Biological evidence management for DNA analysis in cases of sexual assault. *The Scientific World Journal* 2015;
2. Linacre, A., Pekarek, V., Swaran, Y.C., and Tobe, S.S. (2010). Generation of DNA profiles from fabrics without DNA extraction. *Forensic Sci Int Genet* 4, 137-141;
3. Larkin, A., and Harbison, S.A. (1999). An improved method for STR analysis of bloodstained denim. *Int J Legal Med* 112, 388-390.
4. Geng, Tao, and Richard A. Mathies. (2015). "Minimizing inhibition of PCR-STR typing using digital agarose droplet microfluidics." *Forensic Sci Int Genet* 14: 203-209.

Collection methods of semen stains in textiles, with PCR inhibitors, for DNA analysis

M. Gouveia^{1*}, B. da Silva^{2*}, A. Capitão¹ and L. Cainé^{2,3}

* Equal author contribution

¹ Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Porto, Portugal

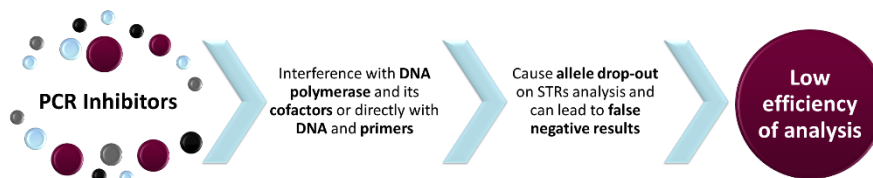
² Department of Forensic Genetics and Biology, North Delegation, National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences, I.P., Porto, Portugal

³ Department of Legal Medicine and Forensic Sciences, Faculty of Medicine, University of Porto, 4200-450 Porto, Portugal

Introduction

Sexual assaults (SA) are a major public health issue in our society and affect mostly womankind. In SA, if the perpetrator is male, semen detection and analysis can be extremely important not only to prove sexual contact, but also to help identify the perpetrator. Among the most relevant evidence in this type of investigations are the victim clothes (e.g. underwear), vaginal and anal swabs and bed linen.

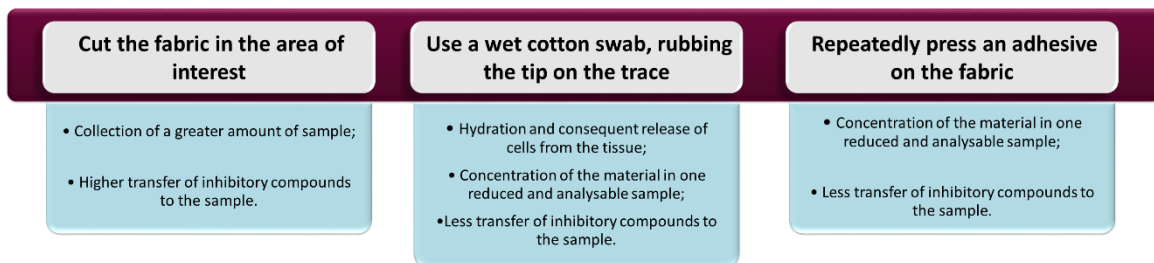
In forensic samples it is common to find PCR inhibitors such as hematin, melanin, organic acids, collagen, calcium and indigo dye (a pigment found in textiles like jeans), among other textile dyes. The presence of those can cause problems in DNA analysis and data interpretation. Thus, it is imperative to find solutions to overcome this problem.



The removal or concentration reduction of inhibitors prior to PCR amplification is essential for genotyping success. Some of these compounds have physicochemical properties identical to DNA and therefore remain in the sample after the extraction and purification. The most frequently used technique to overcome this problem is the dilution of the sample in order to minimize the concentration of inhibitor and its effects. However, this technique is not ideal for degraded or low-template DNA samples, such as forensic samples.

Therefore, the improvement of collection techniques may be the next step to enhance the success of genotyping samples that contain inhibitors.

The methods of collecting in tissue include:



The collection method most commonly used is the first one, since it obtains a larger amount of sample. However, transfer of inhibitory compounds is higher than in the other methods. In the presence of DNA inhibitors, the most advantageous method may be using a moistened swab, since in addition to allowing less transfer of inhibitory compounds, it being humidified allows the hydration and releasing of the cells from the fibers, concentrating the DNA in a smaller and analysable sample.

Conclusion

In forensic samples, where the quality/quantity of DNA is usually low, it is essential that the method of collection is as effective as possible. This review aims to highlight the importance of creating a standardized protocol for collecting samples in tissue in order to ensure minimum inhibitor transference while simultaneously a maximum possible quantity of sample to prevent loss of critical samples and improve the efficiency of DNA analysis.

References

- Geng, Tao, and Richard A. Mathies. (2015). "Minimizing inhibition of PCR-STR typing using digital agarose droplet microfluidics." *Forensic Sci Int Genet* 14: 203-209;
- Larkin, A., and Harbison, S.A. (1999). "An improved method for STR analysis of bloodstained denim." *Int J Legal Med* 112: 388-390;
- Linacre, A., Pekarek, V., Swaran, Y.C., and Tobe, S.S. (2010). "Generation of DNA profiles from fabrics without DNA extraction." *Forensic Sci Int Genet* 4: 137-141;
- Magalhães, T., Dinis-Oliveira, R.J., Silva, B., Corte-Real, F., and Nuno Vieira, D. (2015). "Biological evidence management for DNA analysis in cases of sexual assault." *The Scientific World Journal* 2015.